



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**LAS ISOENZIMAS DE LAS HEXOCINASAS DE MAÍZ EN CITOSOL Y  
MITOCONDRIA: CARACTERÍSTICAS DE SU ACTIVIDAD Y SU REGULACIÓN**

***T E S I S***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**SAMUEL ABRAHAM ESTRADA ANTOLÍN**

**MÉXICO, D.F.**

**2011**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                   **Profesor: RAUL GENARO AGUILAR CABALLERO**

**VOCAL:**                           **Profesor: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE**

**SECRETARIO:**               **Profesor: SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO**

**1er. SUPLENTE:**               **Profesora: GLORIA GUTIERREZ VENEGAS**

**2° SUPLENTE:**               **Profesor: NORA ANDREA GUTIERREZ NAJERA**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 114, CONJUNTO E,  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

### **ASESORA DEL TEMA:**

**Dra. Sobeida Sánchez Nieto**

### **SUSTENTANTE:**

**Samuel Abraham Estrada Antolín**

## **Agradecimientos**

Agradecemos a la M. en C. Diana Sánchez Rangel por la asesoría técnica en la detección de la actividad enzimática en geles nativos.

*Este trabajo se realizó con apoyos de:*

- PAPIIT IN203708 y IN220511 DGAPA, UNAM
- CONACYT 90021
- Subprograma 127 "Formación Básica en la Investigación" de la Facultad de Química por la Beca otorgada para la realización de la Tesis de licenciatura.

## **Dedicado a:**

Mi papá y mi mamá por todo el apoyo, consejos y regaños. A mis hermanos, Enrique y Marina, por estar ahí a pesar de mí y que nunca se han negado a dar su ayuda en los momentos necesarios. Mis tios, primos, abuelos que en algún momento me han dado consejos, ayuda y enseñanzas. A mi primo Miguel que me hizo saber que hay momentos en los que uno no puede ser tan flojo.

A Adriana que me ha dado otra visión de la vida y que sigue ahí a pesar de todo.

A mis amigos de la prepa que aún me muestran diferentes formas de ver las cosas y de divertirse (Eduardo, Nínive, Yoselin, la Bandota, Carolina, Jorge, Héctor,....). A Aída porque siempre estuvo dispuesta a darme mucho más de lo que era su responsabilidad y por darme la oportunidad de aprender muchas cosas.

A la gran familia que es el Hospicio, desde el 11 hasta todos los integrantes que fueron llegando a lo largo de la carrera (Luis, Lalo, Joel, Sujhey, Peter, Tomas, Vivi, Hugo nazy-emo, Susy, Diana, Diana y Diana,....,∞). Josefina por ser la persona con la quién podía expresarme libre y sinceramente. Equipo SAMZUP (Viri, Piby, Peter, Sujhey, Sam) por haber logrado trabajar a pesar de "medipork". También a Paaaauuuu.....ina y a Sujhey por haber enseñado que 1,1,1,1, y 4,4,44,4, son más que números.

Finalmente, a todos los integrantes del lab (Dra. Sobeida, Pau, Viri, Fer, Viri Luna, Silvia, Viri Ca) que me hicieron pasar buenos momentos durante mi estancia en el laboratorio y me ayudaron en muchas cosas.

# ÍNDICE

<b>Índice de Figuras</b>	<b>1</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>3</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>7</b>
<b>Maíz</b>	<b>7</b>
<b>Germinación</b>	<b>8</b>
<b>Importancia y metabolismo de los carbohidratos en plantas</b>	<b>9</b>
<b>Hexocinasa</b>	<b>13</b>
Generalidades	13
Isoformas de hexocinasa	15
Características Bioquímicas de la HK	17
Distribución subcelular de la HK	20
Señalización por carbohidratos mediado por hexocinasa	24
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>27</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>28</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>28</b>
<b>Objetivos particulares</b>	<b>28</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>

<b>A. Diseño Experimental</b>	<b>29</b>
<b>B. Material Biológico.</b>	<b>30</b>
<b>C. Extracción De La Hexocinasa.</b>	<b>30</b>
<b>D. Determinación De Proteína Por El Método De Bradford</b>	<b>31</b>
<b>E. Medición De La Actividad Hexocinasa in vitro</b>	<b>32</b>
<b>F. Determinación De Actividad HK En Geles De Poliacrilamida Nativos Y Desnaturalizantes</b>	<b>36</b>
Detección de actividad en geles de poliacrilamida nativos.	36
Detección de actividad en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE).	39
<b>G. Determinación de pesos moleculares y Rf de las isoenzimas HK en geles de poliacrilamida</b>	<b>41</b>
Curva patrón de PM	41
Datos de PM para las muestras de planta completa en PAGE-SDS	43
Rf de las isoformas HK en geles nativos de poliacrilamida.	47
<b>H. Secuenciación De Las Isoformas De La Hexocinasa De Maíz</b>	<b>53</b>
<b><i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i></b>	<b>55</b>
<b>Detección y comparación de los niveles de hexocinasa en diferentes tejidos de una planta de maíz.</b>	<b>55</b>
Hexocinasas citosólicas	55
Hexocinasas mitocondriales	62
<b>Detección y comparación de los niveles de hexocinasa en embriones de maíz embebidos en presencia o ausencia de carbohidratos</b>	<b>66</b>
Hexocinasas citosólicas	66

Hexocinasas mitocondriales	70
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>76</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO I. Programación De Lecturas En El Multiscan</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO II. Descripción De La Preparación De Geles De Poliacrilamida Nativos</b>	<b>80</b>
Reactivos y soluciones	80
PAGE-SDS	81
<b>ANEXO III. Determinación De Proteína Por El Método De Bradford</b>	<b>82</b>
Muestras de la planta:	83
Muestras de embriones:	84
<b>REFERENCIAS</b>	<b>85</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática del embrión de maíz.....	7
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo de las fases de toma de agua de la semilla.....	8
<b>Figura 3.</b> Esquema del catabolismo de sacarosa, almidón y fructanos en un tejido demandante de carbohidratos.....	10
<b>Figura 4.</b> Las hexosas fosfato metabolitos importantes en el metabolismo en plantas.....	12
<b>Figura 5.</b> Modelo de la HK de rata.....	18
<b>Figura 6.</b> Distribución subcelular de las hexocinasas.....	21
<b>Figura 7.</b> Modelo propuesto de la interacción de la hexocinasa en la mitocondria.....	23
<b>Figura 8.</b> Percepción y respuesta de los hepatocitos a cambios en la concentración de glucosa.....	24
<b>Figura 9.</b> Esquema general de los tratamientos que recibieron los embriones de maíz.....	29
<b>Figura 10.</b> Protocolo de determinación de actividad de hexocinasa en las muestras de embriones.....	32
<b>Figura 11.</b> Curvas temporales de actividad de hexocinasa.....	34
<b>Figura 12.</b> Actividad de hexocinasa en presencia de glucosa, fructosa y glucosa más inhibidor.....	35
<b>Figura 13.</b> Reacción de reducción del NBT por protones.....	36
<b>Figura 14.</b> Curva estándar de peso molecular en gel de poliacrilamida-SDS.....	41
<b>Figura 15.</b> Curvas de estándar de peso molecular.....	42
<b>Figura 16.</b> Actividad de Hxks de la fracción citosólica de tejidos de planta de maíz.....	56
<b>Figura 17.</b> Isoformas de hexocinasa de las fracciones citosólicas de tejidos de planta.....	58
<b>Figura 18.</b> Detección de isoformas de hexocinasas de las fracciones citosólicas de diferentes tejidos de una planta madura en geles nativos.....	61
<b>Figura 19.</b> Actividad de Hxks de la fracción mitocondrial de diferentes tejidos de una planta de maíz.....	63

<b>Figura 20.</b> Isoformas de hexocinasa de las fracciones mitocondriales de tejidos de ..... planta	63
<b>Figura 21.</b> Patrón de isoformas de la hexocinasa mitocondrial de diferentes tejidos de una planta madura de maíz.....	66
<b>Figura 22.</b> Actividad de hexocinasas de las fracciones citosólicas de embriones embebidos en diferentes carbohidratos.....	68
<b>Figura 23.</b> Determinación del peso molecular de las hexocinasas citosólicas de embriones.....	69
<b>Figura 24.</b> Patrón de isoformas de la hexocinasa citosólica de embriones.....	70
<b>Figura 25.</b> Actividad de hexocinasas de las fracciones mitocondriales de embriones.....	71
<b>Figura 26.</b> Determinación del peso molecular de las hexocinasas mitocondriales de embriones.....	72
<b>Figura 27.</b> Patrón de isoformas de la hexocinasa mitocondrial de embriones.....	73
<b>Figura 28.</b> Ensayo de actividad hexocinasa en presencia de inhibidor (NAG).....	74

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Constantes cinéticas de hexocinasas de planta para sus sustratos _____	19
<b>Tabla 2.</b> Componentes utilizados para la preparación de geles de poliacrilamida nativo _____	37
<b>Tabla 3.</b> Amortiguador de reacción. Sales y amortiguador utilizados en la mezcla de reacción para detectar actividad de hexocinasa _____	38
<b>Tabla 4.</b> Mezcla de reacción con sustratos _____	38
<b>Tabla 5.</b> Reactivos utilizados para preparar un gel de poliacrilamida-SDS _____	39
<b>Tabla 6.</b> Valores de PM y de Rf del marcador de peso molecular (BIO-RAD®). _____	41
<b>Tabla 7.</b> Datos de Rf y peso molecular, en KDa, de las muestras de planta completa _____	43
<b>Tabla 8.</b> Valores de PM y Rf de las muestras de planta de la fracción mitocondrial _____	44
<b>Tabla 9.</b> Muestras de la fracción citosólica de las muestras de embriones sembrados en carbohidrato a concentración 5 mM y 50 mM _____	45
<b>Tabla 10.</b> Muestras mitocondriales de las muestras de embriones de maíz sembrados en carbohidratos a concentración 5 y 50 mM _____	46
<b>Tabla 11.</b> Valor de Rf puesto que las muestras corrieron en condiciones nativas _____	47
<b>Tabla 12.</b> Muestras mitocondriales de planta _____	48
<b>Tabla 13.</b> Rf de las isoformas en muestras citosólicas de embriones sembrados en carbohidrato a concentración de 5 mM. _____	50
<b>Tabla 14.</b> Rf de las isoformas de la fracción mitocondrial de embriones de maíz _____	50
<b>Tabla 15.</b> Rf de las isoformas de HK citosólica de embriones sembrados en carbohidrato a concentración 50 mM _____	51
<b>Tabla 16.</b> Isoenzimas en las muestras de la fracción mitocondrial en embriones de maíz _____	52

## **ABREVIATURAS**

ANT	Traslocador de adenín nucleótidos
FK	Fructocinasa
Fru	Fructosa
Gal	Galactosa
Glc	Glucosa
GK	Glucocinasa
G6P	Glucosa 6 fosfato
G6PDH	G6P deshidrogenasa
HK	Hexocinasa
INV	Invertasa
$K_i$	Constante de inhibición
$K_m$	Constante de Michaelis-Menten
MSTs	Transportadores de monosacáridos de membrana plasmática
NAG	N-acetilglucosamina
NBT	Nitroblue tetrazolium
OPP	Vía oxidativa de las pentosas fosfato
PGI	Fosfoglucona isomerasa
SUT	Transportadores de sacarosa
SuSy	Sacarosa sintetasa
Suc	Sacarosa
Sorb	Sorbitol
VDAC	Canal iónico dependiente de voltaje

## **RESUMEN**

Una característica esencial de la vida de todo organismo es la adaptación constante a los cambios que tienen lugar en su entorno. Para ello, esas variaciones ambientales deben ser leídas y traducidas en una respuesta fisiológica. La naturaleza de los mecanismos de señalización y la respuesta celular varía en función de la complejidad del organismo. Uno de los cambios que modifica la expresión de genes en las plantas, es el contenido de carbohidratos. En la germinación de una semilla de maíz, la eventual salida de la radícula lleva consigo cambios en la expresión de genes que puede ser mediada por la percepción de la glucosa y su transducción. Una de las enzimas que se ha planteado de manera recurrente en la literatura que tiene la capacidad de percibir a la glucosa y de extender esta señal a otras proteínas es la hexocinasa.

En un trabajo previo en el laboratorio, se encontró que cuando se germinan embriones de maíz durante 24 en presencia de diferentes carbohidratos, se induce la expresión de isoenzimas distintas de hexocinasa citosólica. Esto plantea la idea de que las hexocinasas son susceptibles de ser reguladas a nivel transcripcional o traduccional por carbohidratos; por lo que en el presente trabajo se determinaron que isoenzimas de hexocinasas en dos compartimentos en donde la enzima puede localizarse el citosol y la mitocondria, con la finalidad de encontrar si cambiaban al embeber el tejido en concentraciones bajas o altas de glucosa o sacarosa. Para ello se determinó la actividad de la hexocinasa tanto *in vitro* como en geles de poliacrilamida.

Adicionalmente, ya que no se han descrito las isoenzimas de la planta de maíz, se realizó la determinación de la actividad de la enzima *in vitro* y en geles nativos. La actividad de hexocinasa tanto en citosol como en mitocondria fue distinta. La actividad de hexocinasa de raíz, usando como sustrato glucosa o fructosa, fue la mayor, seguida de la del tallo, hoja y finalmente la espiga. Pero al usar fructosa la actividad en raíz fue 2 veces menor a la citosólica. El inhibidor de la actividad de hexocinasa no unida a citosol, N-acetilglucosamina (NAG), fue utilizado para discriminar el tipo de isoenzimas. La actividad de hexocinasa usando fructosa como sustrato no produjo inhibición; en cambio con glucosa hubo inhibición, sobre todo en tallo (78%) y la de menor fue la espiga (28.1%), sugiriendo contaminación de enzima unida a membranas. En todas las fracciones citosólicas de los diferentes tejidos se encontraron dos bandas una de aproximadamente 42 KDa y la otra de 95 KDa, excepto en espigas en donde la banda de bajo peso molecular es de 55 KDa, pesos moleculares ya reportados para otras hexocinasas de plantas.

En mitocondria, las raíces presentan la mayor actividad de hexocinasa, seguido de la hoja y luego del tallo. La actividad es aún mayor a la detectada en las fracciones citosólicas. Todos los tejidos excepto el tallo (40% inhibición) presentaron un 100% de inhibición con NAG, lo que nos da confianza de que la fracción es puramente mitocondrial. Al medir la actividad de hexocinasa en presencia de fructosa encontramos que todos los tejidos estudiados presentaban actividad y todos eran inhibibles por NAG, excepto los tallos. Para todos los tejidos de la planta se presenta una banda de aproximadamente 120 KDa, excepto para los embriones en donde se observa una

banda más de peso mayor a 250 KDa. Lo anterior indica que la hexocinasa se está oligomerizando. Reporte novedoso en plantas pero que en otros modelos biológicos ya se ha reportado.

Se hallaron usando geles de poliacrilamida nativos 5 isoenzimas en la fracción mitocondrial y hasta 9 isoenzimas en citosol, no todas las bandas están presentes en todos los tejidos de la planta de maíz, aunque los embriones son las que contienen más.

En la búsqueda de las isoenzimas que pudieran ser reguladas por carbohidratos se germinaron embriones de maíz en distintos carbohidratos. Se encontró que las actividades de las fracciones citosólicas de embriones embebidos en agar, sorbitol, glucosa y sacarosa usando glucosa y fructosa como sustrato eran similares independientemente de si se incubaba el tejido con los carbohidratos a 5 mM o a 50 mM. La actividad fosforilante de glucosa es más susceptible a la inhibición por NAG que la de fosforilación de fructosa. La inhibición de la actividad de hexocinasa con NAG fue de 50 al 62% al medir la actividad con glucosa. En cuanto a las isoenzimas se detectaron 6 bandas de hexocinasas en los geles nativos de las fracciones citosólicas. Las bandas 1, 2, 3 y 4 fueron las más tenues y de intensidad semejante a la mayoría de las condiciones probadas. Pero las bandas 5 y 6 si fueron distintas en intensidad.

En cuanto a la actividad de las hexocinasas mitocondriales se observa que hay una tendencia a disminuir cuando los embriones son tratados con los carbohidratos, ya sea a 5 o 50 mM de éstos, aunque la diferencia no es significativa cuando se mide la actividad en presencia de glucosa. La actividad fosforilante en presencia de fructosa es 3 veces menor en las fracciones mitocondriales de embriones tratadas con 50 mM de sorbitol, fructosa y sacarosa. En cuanto a los pesos moleculares, se encontró que hay dos bandas por arriba de 100 KDa, lo que indica que la enzima se encuentra en forma agregada. Un peso molecular aproximado de 250 y otra de 120 KDa. Los pesos moleculares mínimos encontrados en este estudio fueron de 42 a 55 KDa, por lo que si tomamos estos pesos como el del monómero tendríamos un complejo de 6 a 5 hexocinasas o de 3 a 2 hexocinasas unidas. La formación de oligómeros de la enzima mitocondrial consigo misma es la primera vez que se observa en plantas.

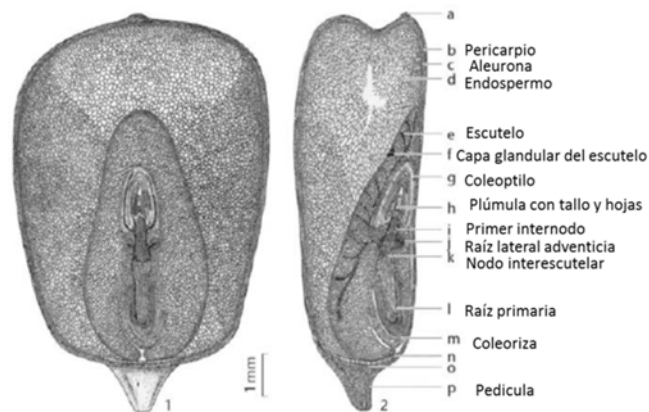
A pesar de no encontrarse una regulación diferencial de isoformas en el citosol o en la mitocondria en los embriones de maíz, cabe destacar que es la primera vez que se observa que hay formación de oligómeros de alto peso molecular, lo que nos lleva a plantearlos varias preguntas ¿si es la forma oligomérica la que funciona in vivo?, ¿si el complejo proteico se encuentra formado por exclusivamente la hexocinasa o está acompañado de otras enzimas mitocondriales que pueden afectar su actividad? Y si tiene relevancia la presencia de distintos carbohidratos en cuanto a la formación de oligómero, como ocurre en otros organismos.

# ANTECEDENTES

## Maíz

*Zea mays*, comúnmente llamado maíz, es una planta de la familia de las Poaceae y es un producto muy utilizado por el humano. El maíz está compuesto principalmente por hojas, el tallo principal está segmentado y a lo largo de este hay segmentaciones llamadas nodos. Cada uno de los nodos tiene una sola hoja en posición contraria a la hoja vecina [1].

La semilla del maíz que es el sujeto biológico de este trabajo tienen tres partes principales: el pericarpio, el endospermo y el embrión (Figura 1). El endospermo y el embrión contienen el material genético. La capa más externa del endospermo comprende una capa única de células especializadas llamada aleurona. El endospermo contribuye en un 85% al peso de la semilla y es la fuente de nutrimentos para el embrión durante la germinación. El embrión tiene un eje central, el eje embrionario, el cual termina en la punta basal por la raíz primaria [1].

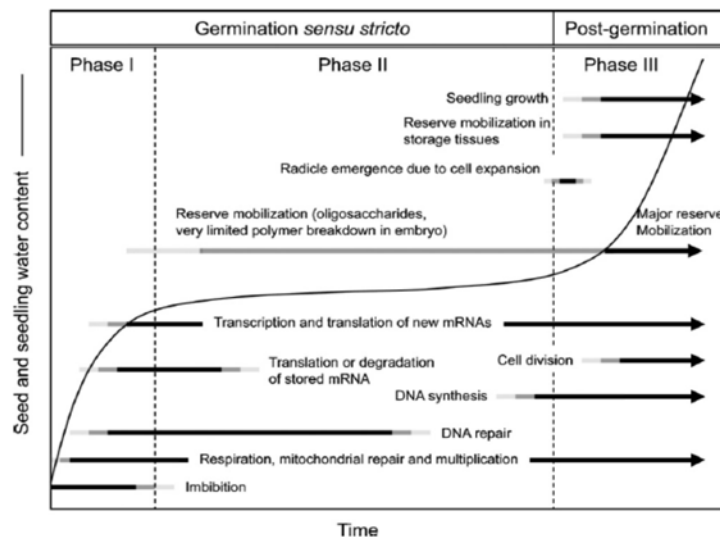


**Figura 1.** Representación esquemática del embrión de maíz (Leszek y Vincent 2002). Vistas superior y lateral mostrando las partes que componen a la semilla de maíz.

En climas templados, la mayoría de las semillas maduras consisten de un embrión rodeado por endospermo y una cobertura de la semilla (testa); teniendo un bajo porcentaje de humedad (5%-15%) y con una actividad metabólica reducida.

## Germinación

La germinación resulta de una combinación de eventos celulares y metabólicos, coordinados por una cadena regulatoria compleja que incluye la dormancia de la semilla, que es una habilidad intrínseca para bloquear temporalmente la elongación de la radícula, esto es para favorecer la germinación cuando las condiciones ambientales sean óptimas [2]. Por lo que, para que la germinación ocurra, las semillas quiescentes solo necesitan ser hidratadas bajo condiciones que favorezcan su metabolismo, tal como una temperatura viable y la presencia de oxígeno. Como se mencionó, la germinación de la semilla puede ser retrasada por la dormancia, un proceso que involucra en muchas ocasiones la interacción entre dos factores de crecimiento u hormonas de la planta, giberilinas (GAs) y ácido abscísico (ABA) [2].



**Figura 2.** Esquema representativo de las fases de toma de agua de la semilla. Tomado de Nonogaki *et al.* 2010.

Por definición, la germinación de una semilla comienza con la toma de agua y se completa con la aparición de la radícula en el embrión. Inicialmente hay una rápida entrada de agua por la semilla seca (fase I), hasta que todas las matrices y células contenidas en la semilla son hidratadas, fenómeno físico que ocurre tanto en semillas en estado de dormancia como en semillas en las que la germinación es activa (Figura 2). Esto es seguido de un periodo de toma de agua limitado (fase II), el cual permanece



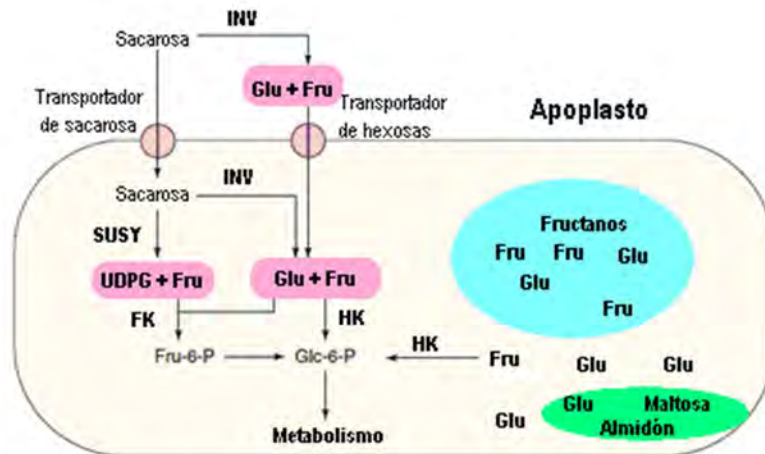
sin cambio en la semilla poco antes de completar la germinación, pero que metabólicamente es el más activo. El incremento en la toma de agua asociado con la fase III es inicialmente, y brevemente, relacionada a la finalización de la germinación [3]. Los fenómenos que ocurren posteriores a la fase III son denominados eventos post-germinativos en donde se destaca la movilización de reservas contenidas en el endospermo de la semilla.

Las semillas secas maduras contienen lo necesario para reiniciar su metabolismo toda vez que ocurra la entrada de agua, por ejemplo las semillas secas contienen mitocondrias con una pobre diferenciación en sus membranas internas, pero están presentes enzimas funcionales necesarias para la respiración, como las del ciclo de Krebs, y oxidasas terminales, y proveen suficiente ATP para la fosforilación varias horas después del inicio de la imbibición de la semilla.

Otras dos vías respiratorias, glicólisis y la vía oxidativa de las pentosas fosfato (OPP), también son activadas durante la imbibición de las semillas, aunque muchas semillas experimentan temporalmente condiciones anaerobias durante la imbibición. La vía glicolítica predomina cuando la producción de ATP mitocondrial está restringida por la baja disponibilidad de oxígeno. En contraste, cuando la mitocondria se vuelve activa la OPP es predominante [3].

### ***Importancia y metabolismo de los carbohidratos en plantas***

Los carbohidratos sirven como nutrientes y componentes estructurales, pero también como moléculas señal para controlar el metabolismo, el crecimiento y el desarrollo en organismos eucariontes y procariontes. La capacidad señalizadora de los carbohidratos se debe a que activan o reprimen una gran diversidad de genes, muchos de ellos involucrados en la regulación del ciclo celular, fotosíntesis, metabolismo de carbono y nitrógeno. Lo anterior lleva a que el organismo de respuesta al estrés, a que ocurran cambios en el proceso de la germinación, el establecimiento del desarrollo vegetativo y reproductivo y la senescencia [4, 5, 6].



**Figura 3.** Esquema del catabolismo de sacarosa, almidón y fructanos en un tejido demandante de carbohidratos (Tomado y adaptado de Pego y Smeekens 2000).

Son diversas las fuentes de carbohidratos en la planta, por lo que la disponibilidad, concentración y tipo de carbohidrato varía no solo respecto a la fase del desarrollo sino también en el tipo de tejidos y en los diferentes compartimentos subcelulares (Figura 3). Por ejemplo, la sacarosa es sintetizada en las hojas (tejido fuente) y es transportada vía floema hacia tejidos demandantes, donde es almacenada o catabolizada para la síntesis de almidón o para el metabolismo heterotrófico y el crecimiento [4, 7]. Así la célula demanda puede tener concentraciones variables de sacarosa en sus apoplastos.

La sacarosa es transportada al interior celular gracias a la actividad de sus transportadores de Suc (SUTs) (Figura 3). Alternativamente la Suc es hidrolizada en los apoplastos por las invertasas (INV), elevando las concentraciones de las hexosas, las cuales, subsecuentemente son tomadas por transportadores de monosacáridos de la membrana plasmática (MSTs) (Figura 3).

Dentro de las células la sacarosa es escindida por la INV o por la sacarosa sintetasa (SuSy) [4, 8], que cataliza la conversión de Suc y UDP a Fru y UDP-D-glucosa (UDP-Glc), de acuerdo a una reacción reversible (Figura 3). Por lo que, tanto la actividad INV como de SuSy proveen de hexosas para el metabolismo [4]. En cuanto a

la regulación del catabolismo de la sacarosa hay que mencionar que una elevada concentración de Fru libre en el citosol, inhibe la actividad de SuSy [7]. La reacción catalizada por SuSy es reversible y ha demostrado estar cerca del equilibrio en papa [9]. Por otro lado la expresión de la INV de levadura en papa, llevó a una reducción de entre 10-15% del contenido de almidón. Evidencia directa de un flujo incrementado a través de la vía respiratoria dada por el incremento de la proporción ATP/ADP y por el gran aumento de CO<sub>2</sub> producido por las papas transgénicas [9].

En hojas fotosintéticas, el almidón se acumula durante el día en los cloroplastos, denominado almidón transitorio, y fuente importante de glucosa durante la noche. En concordancia con una vía predominantemente  $\beta$ -amilolítica, los catabolitos del almidón son exportados al citosol durante la noche como maltosa y glucosa. La exportación de maltosa al citosol ocurre a través de un transportador específico de maltosa en la membrana del cloroplasto. Al parecer, la degradación del almidón de las hojas, proporciona cantidades sustanciales de Glc citosólica, lo cual puede llevar a un mayor flujo de carbono a través de la reacción de la hexocinasa (HK) en el citosol [4].

Los fructanos son otra reserva de carbohidrato, en plantas superiores, aparte del almidón. Los fructanos son oligómeros y polímeros solubles de fructosa que son almacenados en las vacuolas de células fotosintéticas y de almacenamiento. Varias fructosiltransferasas (FTFs) específicas, catalizan la síntesis de fructanos en la vacuola, con sacarosa como único precursor. Consecuentemente, la acumulación de fructanos libera sustanciales cantidades de Glc, la cual puede salir de la vacuola a través de fosforilación. También la degradación de fructanos produce grandes cantidades de Fru, la cual puede servir como sustrato para HK y FK (fructocinasa) citosólica [4].

Los oligosacáridos de la familia de la rafinosa (RFO) son muy comunes en las semillas, donde pueden servir como agentes tolerantes de la desecación o como carbohidratos de reserva para el suministro de reserva para la semilla durante la germinación. Esta degradación probablemente involucra a tres enzimas INV,  $\alpha$ -

galactosidasa y  $\alpha$ -glucosidasa. La liberación de Glc, Fru y Gal podría alimentar subsecuentemente la reacción de HK [4].

Por otra parte, la síntesis de sacarosa ocurre vía SuSy, o por la actividad secuencial de dos enzimas la Suc-fosfato sintasa (SPS) y Suc-fosfato fosfatasa (SPP). Se ha propuesto la existencia de ciclos de síntesis y degradación de sacarosa que llevan a amortiguar o ajustar el metabolismo o el uso del ATP. En otros términos, el ciclo de Suc puede contribuir a la modulación del flujo de carbono a través de HK y la glicólisis por medio de la desaparición de ATP, aunque otros factores parecen estar involucrados [4].



**Figura 4.** Las hexosas fosfato metabolitos importantes en el metabolismo en plantas.

Las hexosas son importantes metabolitos en la célula, pero para ser utilizadas en el metabolismo deben estar presentes en su forma fosforilada, siendo relevante la actividad de la hexocinasa, enzima glicolítica que contribuye a la distribución de

carbohidratos para la respiración y para proveer intermediarios de carbono para numerosas vías anabólicas [4].

Si bien el metabolismo glicolítico es la principal vía para la generación de energía (ATP), sus intermediarios son precursores para la biosíntesis de otros constituyentes celulares. Por ejemplo la G6P alimenta la vía oxidativa de las pentosas fosfato, genera NADPH mediante la actividad de la G6P deshidrogenasa (G6PDH) y se producen compuestos con carbono útiles en las vías anabólicas (Figura 4). Alternativamente, la Glc puede ser convertida a sus formas poliméricas, glucógeno y almidón, los cuales son almacenados por muchos organismos [10].

Otra vía que parte de la G6P y del isómero Fru6P contribuye al suministro de azúcares NDP para la síntesis de polisacáridos no celulósicos de la pared celular y glicosilación de glicoproteínas y pequeñas moléculas lipofílicas. Mientras que el G6P es isomerizado por la fosfoglucomutasa (PGM) a G1P, el cual puede transformarse en UDP-Glc por la UDP-D-glucosa pirofosforilasa (UDPasa), útil en la síntesis de polisacáridos no celulósicos de la pared celular y la glicosilación de glicoproteínas y pequeñas moléculas lipofílicas [4], o bien para la síntesis de almidón (Figura 4).

Desde el punto de vista del flujo metabólico, la reacción de la hexocinasa, juega un papel importante en el movimiento de hexosas libres del citosol, canalizando los carbohidratos a la glicólisis o a la biosíntesis, dependiendo de la demanda celular [11].

## ***Hexocinasa***

### *Generalidades*

La hexocinasa es una enzima ubicua (ATP: D-hexosa-6-fosfotransferasa) [11, 12], que se encuentra presente en prácticamente todos los seres vivos como levaduras, plantas y mamíferos [13]. Es una enzima denominada “housekeeping” por encontrarse

en todo momento en todas las células [14]. En vista a la especificidad hacia el sustrato el nombre más apropiado para la enzima es hexocinasa EC 2.7.1.1 [15]. La clasificación de las HKs se hace respecto a su afinidad por el sustrato [12].

Existe una confusión en la terminología, se ha propuesto que los nombres de los genes HK deben ser basados en la similitud de la secuencia génica y la correspondiente secuencia deducida de aminoácidos respecto a la encontrada en *Arabidopsis* y tomate [16].

La fosforilación de la D-glucosa (Glc) por el ATP constituye la etapa iniciadora en la que la molécula de Glc se transforma en una molécula de carga negativa, metabolito clave en diversas vías metabólicas (Figura 4). En las células existe relativamente poca cantidad de Glc libre; la mayor parte de la glucosa intracelular se halla en su forma fosforilada. La reacción catalizada por la enzima es la siguiente [14]:



El producto principal de la HK, la G6P, no solo alimenta la glicólisis en citosol y plastidio, sino también es un precursor para la OPP y para la biosíntesis de ácidos grasos, almidón y polisacáridos de la pared celular en sus respectivos compartimentos [4]. La gran disminución de energía libre estándar de la reacción de HK en la dirección de formación de G6P, indica que no es una reacción reversible en condiciones intracelulares. La defosforilación enzimática de G6P para regenerar Glc libre, se produce por acción de la glucosa-6-fosfatasa, enzima que en mamíferos no se encuentra en todos los tejidos [14].

La HK cataliza la producción de hexosas 6-fosfato, y en plantas, la enzima fosforila varias hexosas incluyendo D-glucosa (Glc), D-fructosa (Fru), D-manosa (Man) y D-galactosa (Gal) [4, 12, 17]. De esta manera las HK se diferencian en glucocinasa (GK), fructocinasa (FK), manocinasa (MK) y galactocinasa (GalK), las cuales son altamente específicas para su sustrato y las que tienen niveles similares de

especificidad para diferentes hexosas se nombran hexocinasas [4, 8, 12]. La enzima posee mayor afinidad por las aldohexosas que por las cetohehexosas [16]. Esta especificidad hacia las hexosas, hace de esta enzima una proveedora de sustratos para la glicólisis.

### *Isoformas de hexocinasa*

Múltiples isoformas de HK han sido observadas en una amplia variedad de especies y tejidos. Sin embargo, la significancia fisiológica de esta heterogeneidad requiere ser clarificada [4].

En *S. cerevisiae* hay 3 HK que son la HKPI (HK1), la HKPII (HK2) y la GK (GK1). El producto del gen HK2 parece tener una función importante en la respuesta mediada por Glc [18]. Análisis de varias mutantes de levadura revelan que la HKPII codificada por *HXK2*, tiene una función como sensor de glucosa [17]. La galactocinasa de levadura representa una segunda clase de hexocinasas bifuncional. No solo está involucrada en el metabolismo de galactosa, sino también, como sensor en la cascada de señalización por carbohidratos [16]. Las células de levadura muestran una remarcable preferencia por Glc como fuente de carbono debido a que este azúcar puede ser convertido rápidamente a etanol, lo cual representa una ventaja selectiva a las levaduras tolerantes a etanol [6].

En mamíferos han sido encontradas 4 diferentes enzimas; tres de ellas son hexocinasas y el nombre de la cuarta enzima ha sido sujeto de debate, ya que muchos la colocan como glucocinasa, sin embargo su  $K_m$  la ubica dentro de las hexocinasas (HKIV). Adicionalmente, esta enzima ha sido implicada como un sensor de glucosa involucrado en la liberación de insulina en células  $\beta$  del páncreas [12,16].

Las hexocinasas de plantas son una familia que contiene en las dicotiledóneas entre 5 a 7 miembros y en las monocotiledóneas de 8 a 11 integrantes [19]. Algunas

enzimas fosforilantes de hexosas se han caracterizado, por ejemplo, en embriones de arroz hay 6 isoformas de HK; tres GK (GK1-GK3), una FK (FK1) y dos formas no específicas (HK1 y HK2) [17]. En *Arabidopsis* hay 6 formas de HK con actividad catalítica y tres isoformas que por su secuencia son similares a las hexocinasas pero no presentan actividad catalítica y que se denominan “hexokinase-like” (HKL) [19].

Las HK1 y HK2 de *Arabidopsis* muestran alta afinidad a Glc, menor afinidad a Man y una muy baja especificidad por Fru. En comparación YHK2 (enzima de levadura) exhibe una alta afinidad por Man y por Fru. La Galactosa, 3-O-metilglucosa y 6-desoxiglucosa no influyen en la actividad hexocinasa, mientras que la glucosamina y 2-desoxiglucosa producen una clara inhibición a altas concentraciones. La trehalosa no causa inhibición; de hecho la trehalosa-6-fosfato (T6P) es un efectivo inhibidor para YHK2 pero no para AtHK1 y AtHK2 [12].

Estudios en plantas de *Arabidopsis* realizando mutaciones en el gen de la HK1 muestran que esta isoenzima tiene una función en el mejoramiento de la utilización de la luz para promover la expansión celular en raíz, hojas y en la inflorescencia [20]. AtHK1 ha sido implicada como un sensor de glucosa así como las dos isoformas de arroz, OsHK6 y OsHK8 [19, 20, 21].

En cuanto a la **fructocinasa** (FK, EC 2.7.1.4) es una enzima con alta afinidad específica por fructosa. La FK de plantas y bacterias catalizan la conversión de Fru a fructosa-6-fosfato, mientras que la FK de mamíferos (también conocida como cetohehexocinasa [KHK]) fosforila la Fru a fructosa-1-fosfato [16, 22]. La actividad de la enzima tiene una función importante en la producción de almidón en tejidos fuente, donde SuSy transforma la Suc entrante en UDP-Glc y Fru.



## Características Bioquímicas de la HK

Aunque existen en las bases de datos varios genes putativos para la HK, sólo unos cuantos genes de hexocinasa de planta han sido clonados y estudiados en detalle, incluidos los de *Arabidopsis* (*AtHXK1* y *AtHXK2*); espinaca (*SoHXK1*); papa (*StHXK1* y *StHXK2*); y tomate (*LeHXK1*, *LeHXK2*, *LeHXK3* y *LeHXK4*). Las hexocinasas de tomate son de aproximadamente 500 aminoácidos, con un peso molecular promedio de 54 KDa [4, 23].

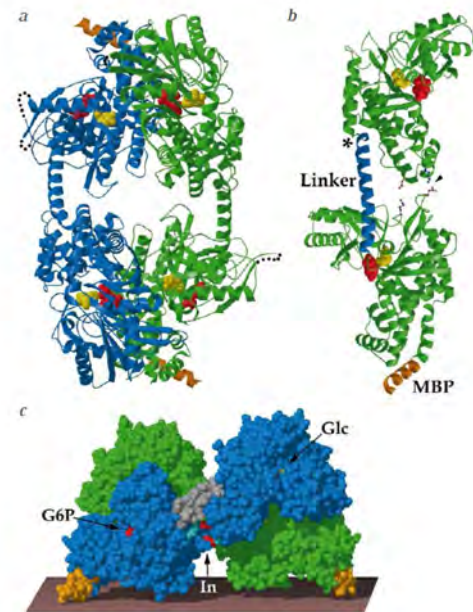
En germen de trigo han sido identificadas 4 isoenzimas, 2 de ellas son monómeros de 52 KDa y las otras dos con 100 KDa de peso molecular; esta enzima presenta inhibición competitiva por ADP y es prácticamente insensible a la inhibición por G6P; esto puede sugerir que la hexocinasa de germen de trigo tiene un papel importante en la síntesis de polímeros de carbohidratos [13].

En la mayoría de las plantas, la FK se presenta como un dímero. En cuanto a los pesos moleculares, existe una gran variación dependiendo de la especie en la que se estudie, el peso nativo para tomate, papa, cebada, soya, aguacate y remolacha es de 70-105 KDa; en *Lactococcus lactis* el dímero de FK tiene un peso de 66 KDa [16].

La comparación de secuencias de hexocinasas de diferentes especies revela una alta homología entre la HKIV de 50 KDa de mamífero y las hexocinasas de 100 KDa en mamíferos, éstas últimas aparentemente se desarrollaron por una duplicación de genes. La homología de HKIV a la HK de 50 KDa en levadura es mucho más baja, alrededor de 30% [24].

La hexocinasa de diferentes especies ha sido cristalizada. En la Figura 5 se muestran el dímero (a) y el monómero (b), de la hexocinasa de rata, proteína que se pliega en  $\alpha\beta$ , generalmente 14  $\alpha$ -hélices y 13 hojas- $\beta$ . La estructura cristalográfica de la HKI de rata formando un complejo con Glc y con G6P, revela un dímero simétrico. El dominio N-terminal de un monómero hace estrecho contacto con el dominio C-terminal

de su contraparte simétrica. Aunque la HKI es conocida por ser activa como monómero en solución, la dimerización puede ser inducida de una manera dependiente de la concentración de proteína, principalmente en presencia de G6P [25].



**Figura 5.** Modelo de la HK de rata. En A se observa el dímero y en B el monómero, en ambos hay una estructura predominantemente helicoidal y de hojas beta. En C se muestra el modelo donde se observa la interface entre dominios con sus respectivos sitios de unión para Glc y G6P y en dorado la región amino terminal que interactúa con la placa, pero que *in vivo* se uniría a proteínas mitocondriales (Mulichak *et al.* 1998).

Se ha sugerido que el dímero se produjo por la duplicación y fusión de un gen ancestral de aproximadamente 50 KDa, lo que da cuenta de la existencia de sitios de unión del nucleótido para la Glc y GlcP tanto en la región amino como en la región carboxilo de la proteína, si bien solo la región cercana al carboxilo terminal es catalítica [10, 25, 26].

Los residuos en los sitios de unión a Glc son estrictamente conservados entre todas las secuencias de HK conocidas. El plano ecuatorial de la molécula de azúcar está rodeado por cadenas laterales hidrófilas dentro del espacio de unión, el cuál forma una amplia red de puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la glucosa. En el sitio catalítico, el O6 hidroxilo reactivo está posicionado entre y dentro de enlaces de hidrógeno en Asp 657 y Lys 621. Asp 657 sirve como base catalítica o para posicionar

correctamente la glucosa en O6 para la transferencia del fosfato. Lys 621, otro residuo estrictamente conservado en todas las secuencias hexocinasa conocidas, podría facilitar la transferencia del ión fosfato [25].

La G6P también se une en sitios altamente conservados. En HKI de rata el fosfato está rodeado por el residuo Ser 88, Thr 232 y Ser 415. Un anión sulfato es observado en esta posición; de igual manera hay fosfato inorgánico unido en este sitio. Así, estos residuos definen un sitio de unión aniónico que está a 5.6 Å del 6-OH de la glucosa unida [25].

De acuerdo a sus propiedades cinéticas, las hexocinasas provenientes de diferentes tejidos de planta podrían diferir en sus afinidades por su sustrato preferencial, la glucosa. La  $K_m$  para Glc es generalmente baja y puede variar entre 20 y 130  $\mu\text{M}$ . La afinidad por Man es comparable, con un  $K_m$  en el rango de 20 a 500  $\mu\text{M}$ . En contraste la  $K_m$  para Fru es siempre en el rango mM. Las HK presentan una cinética de Michaelis-Menten con estos sustratos. La concentración citosólica de Glc se encuentra entre 100-400  $\mu\text{M}$ , en tabaco y otras dicotiledóneas; en papa pueden llegar a 30 mM, mientras que las concentraciones de Man y Fru son 3 órdenes de magnitud menores. Consecuentemente, HK fosforila preferentemente Glc en órganos heterotróficos. Como para los nucleósidos trifosfato, en la mayoría de los casos la HK tiene alta afinidad por ATP, con una  $K_m$  entre 50 y 590  $\mu\text{M}$ . Se han encontrado concentraciones superiores a 200  $\mu\text{M}$  en citosol, lo que sugiere que este ATP no es limitante en las células heterotróficas [4].

Sustrato	$K_m(\text{mM})$
D-Glc	0.02-0.13
D-Fru	1.5-30
D-Man	0.02-0.5
ATP	0.05-0.59
UTP	1.3-4.5
GTP	0.75-2.2

**Tabla 1.** Constantes cinéticas de hexocinasas de planta para sus sustratos. Tomado de Claeysen E. et al. (2007).

La pérdida de actividad en el dominio N-terminal podría deberse a una improductiva unión del ATP. La forma ATP-Mg<sup>2+</sup> es necesaria para que exista actividad catalítica. El fosforilo unido putativamente al sitio de unión aniónico se observa para G6P, mientras que el resto de la molécula de ATP interactúa con residuos en la cara adyacente del lóbulo mayor. Los sitios de unión del ATP y G6P traslapan una posición fosfato común. Esto pone al anillo piranos G6P en la posición del catión Mg<sup>2+</sup> asociado con ATP: G6P y el fosfato inorgánico compiten como inhibidores con ATP para un sitio de unión común [25].

A pesar de su afinidad por el sustrato la sensibilidad de HK a los cambios de pH puede variar con la especie de planta o entre las isoformas de la proteína. La hexocinasa puede mostrar una curva de respuesta al pH amplia o estrecha, la última con un pH óptimo entre 8.0 y 8.7.

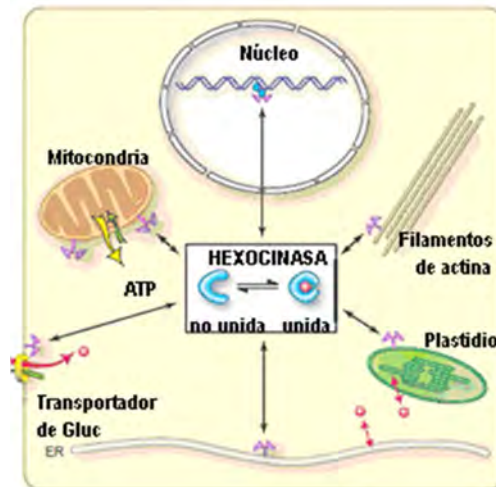
En particular, las propiedades cinéticas de las diferentes isoformas de HK tienen importancia primordial para su regulación *in vivo*, en relación al estado fisiológico de la planta. Propiedades regulatorias adicionales, tal como la sensibilidad a la inhibición por ADP y G6P pueden conferirle características únicas a las hexocinasas de plantas [4].

### *Distribución subcelular de la HK*

Se conoce que la hexocinasa no es exclusiva del citosol, sino más bien se encuentra anclada a membranas, como en la de mitocondrias, Golgi, vacuola y cloroplasto, aunque también se ha reportado en complejos con proteínas dentro del núcleo (Figura 6) [21, 23]. Su localización subcelular tiene consecuencias en su actividad, por ejemplo la hexocinasa nuclear carece de actividad enzimática.

Se ha planteado que hay al menos tres razones para la existencia de varias isoformas: 1) las isoenzimas pueden diferir en sus propiedades catalíticas y regulatorias, satisfaciendo funciones metabólicas particulares; 2) diferencias en la

regulación transcripcional de las isoenzimas podrían permitir su expresión selectiva en tejidos particulares, con respuestas distintas para alterar el estado metabólico; 3) diferencias en la localización subcelular de las isoenzimas podrían resultar en una compartimentación del metabolismo de Glc [10].



**Figura 6.** Distribución subcelular de las hexocinasas y su asociación con varias membranas celulares y los efectos de estas asociaciones en su actividad (Frommer *et al.* 2003).

Las isoformas interactúan con otras proteínas y con membranas celulares, de esta manera, la HK puede estar soluble en el citosol o asociada con los organelos [4, 15]. En plantas, la HK está asociada a la membrana externa del cloroplasto, donde ayudaría en la exportación de Glc, fosforilándola antes de su entrada al citosol. La GK de mamífero está asociada con la actina del citoesqueleto, pero dependiendo de las condiciones fisiológicas, se puede mover al núcleo y alterar la expresión de genes. Las marcadas diferencias en su localización subcelular, refleja que esta enzima tiene múltiples funciones [15].

En raíz de maíz han sido encontradas isoformas activas de HK en citosol, Golgi y fracciones mitocondriales; de igual manera HKs solubles y mitocondriales han sido parcialmente purificadas de hojas de espinacas y chícharo. En arroz hay 6 isoformas detectadas y la GK3, HK1 y HK2 se inhiben con manoheptulosa y glucosamina, un indicativo de que éstas isoformas están localizadas en las mitocondrias [4].

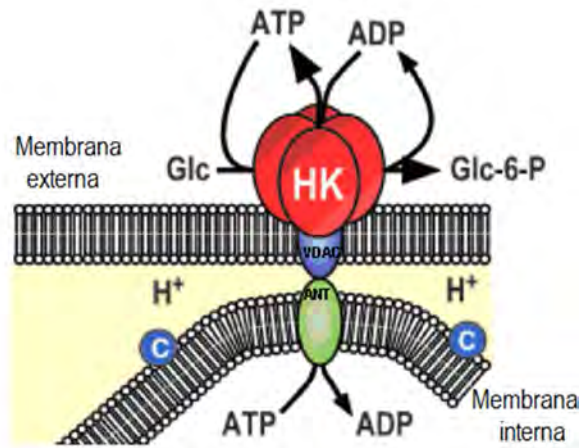
Una porción sustancial de la actividad hexocinasa en plantas está asociada con mitocondria y plastidio, esta última fracción parece estar involucrada en la síntesis de almidón y de ácidos grasos [13]. El 43% de la actividad total Hexocinasa es de la fracción mitocondrial, y el 35% corresponde a la fracción citosólica, el resto de la actividad se encuentra en hexocinasas asociadas a membranas de otros organelos como Golgi, retículo endoplásmico, cloroplastos, vacuolas, plastidios y hasta en núcleo [4, 15, 21, 23]. La  $K_m$  para glucosa de la hexocinasa mitocondrial está entre 0.05 y 0.13 mM, la fracción mitocondrial es fuertemente inhibida por ADP con una  $K_i$  de 0.04 mM, mientras que la fracción citosólica no es inhibida [17].

La localización de las isoformas de HK es fundamental para sus funciones individuales, permitiendo acceso privilegiado al suministro de ATP. Así, la HK anclada a la membrana del cloroplasto tiene uso preferencial por ATP cloroplástico en hojas de espinaca. De manera similar, la HK de plantas unida a la membrana mitocondrial tiene acceso facilitado al ATP mitocondrial, mientras que se reciclaría eficientemente el ADP para mantener la fosforilación oxidativa [4].

Se ha encontrado en mamíferos que la porción N-terminal de la proteína es importante para la localización de la enzima (Figura 5) [4]. Está bien establecido para células de mamíferos con alto requerimiento energético, como neuronas y células cancerosas, donde HK I se encuentra unida a la membrana externa de la mitocondria, es conocida por usar ATP mitocondrial como sustrato en lugar del citosólico. Tal especificidad por el sustrato de HK I se piensa que facilita la conexión entre la actividad respiratoria y la glicolítica, adaptando así la tasa general del metabolismo de Glc para la demanda de energía en células de mamíferos [4, 10].

Viendo hacia el citosol la HK I se une a una porina denominada VDAC (por sus siglas en inglés “voltage dependent anion channel”) y ésta a su vez al traslocador de adenín nucleótidos (ANT), la VDAC es una proteína localizada en la membrana externa mitocondrial, mientras que ANT es una proteína de la membrana interna mitocondrial. Al formarse del complejo HX/VDAC/ANT se tiene un suministro inmediato de ATP

desde la matriz mitocondrial para la fosforilación de la Glc citosólica, e inmediatamente se recicla el ADP hacia la mitocondria (Figura 7) [4, 10].



**Figura 7.** Modelo propuesto de la interacción de la hexocinasa en la mitocondria. Tetrámero de hexocinasa unido al complejo VDAC/ANT llevando a cabo la formación de G6P. (Tomado y adaptado de Robey y Hay, 2005).

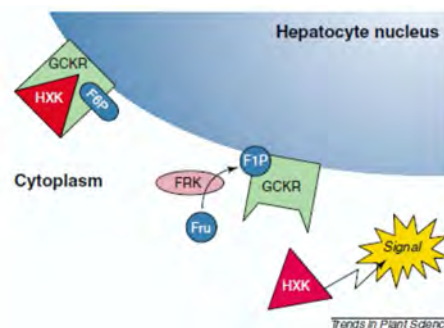
Notablemente, la sensibilidad de las isoformas HK de planta a inhibición por ADP pueden ser de primordial importancia en su función individual. En contraste con las isoformas citosólicas, las HK unidas a membranas mitocondriales, podrían proveer alta sensibilidad a la inhibición por ADP, al menos esto se ha planteado en raíz de maíz [4]. El bloqueo de la formación de NDP-azúcar por ADP ha llevado a proponer que esta isoforma alimenta de G6P a vías demandantes de energía, sólo bajo un índice de ATP/ADP adecuado, actuando así como sensor de carga energética de las células [4].

La orientación y unión de las enzimas a la mitocondria es exclusivamente dependiente de una secuencia de 15 residuos hidrofóbicos en el NH<sub>3</sub>-terminal, los cuales quedan embebidos en la porción hidrofóbica de la membrana mitocondrial externa. La unión de HKI a la membrana externa mitocondrial también induce la oligomerización de esta enzima monomérica (Figura 7); la subsecuente liberación de la enzima de la membrana mitocondrial es dependiente de G6P [11, 25, 26].

## Señalización por carbohidratos mediado por hexocinasa

La HK fue implicada por primera vez en plantas como un sensor de los niveles de hexosas, cuando se encontró que existía la represión de genes del ciclo del glioxilato y los fotosintéticos, no sólo por Glc, sino también por Fru, Man y Gal [4]. Pero fue hasta el trabajo Moore *et al.* (2003) donde se demostró de manera muy elegante que mutantes de hexocinasa que no presentan la capacidad fosforilante, son capaces de percibir la señal de la presencia del carbohidrato y transducirla a un cambio en la expresión de genes, mientras que plantas que no contienen a esta forma de hexocinasa en *Arabidopsis* son incapaces de responder a tratamientos altos de Glc como lo hace la planta silvestre [15]. Por lo que son cambios conformacionales de la enzima al percibir al azúcar, lo que le permiten a la enzima tener su capacidad señalizadora.

Es entonces que adicional a su actividad catalítica, la HK actúa como un sensor de hexosas para modificar la expresión de genes y modular los procesos como la germinación, el crecimiento, el desarrollo vegetativo y reproductivo, la respuesta al estrés y la senescencia, exhibiendo así, un rasgo común con los eucariontes superiores e inferiores. A nivel molecular la HK regula la represión de genes involucrados en la fotosíntesis, el ciclo del glioxilato y la síntesis de  $\alpha$ -amilasa [4, 11, 15]. Esta función sensitiva y de señalización de la HK de planta ha sido revisada como parte de una red de señalización, la cual integra aspectos ambientales junto con los provenientes de azúcares, hormonas, nutrientes y estrés, que gobiernan los programas de desarrollo de la planta.



**Figura 8.** Percepción y respuesta de los hepatocitos a cambios en la concentración de glucosa (Pego y Smeekens, 2000). Tanto la fructosa-6 fosfato como la proteína reguladora (GCKR) de la



hexocinasa IV (HXK) reprimen la actividad de la hexocinasa al re-localizarla en la matriz nuclear del hepatocito. Si la fructocinasa (FRK) produce fructosa 1 fosfato, este se une a la GCKR y se libera la hexocinasa lo que le permite participar en la vía de transducción de la señal por glucosa.

En mamíferos se ha encontrado que la hexocinasa se re-localiza dependiente no solo de su capacidad catalítica, sino también de su relación con otras enzimas fosforilantes de hexosas como es la fructocinasa (Figura 8), en donde en presencia de altas concentraciones de fructosa 6 fosfato se induce la formación de un complejo GCKR (proteína regulatoria de la hexocinasa IV) con la hexocinasa y produce la movilización de la hexocinasa hacia el núcleo [24]. Mutaciones en el gen de la hexocinasa o en GCKR se han asociado al desarrollo de una forma de diabetes no dependiente de insulina. Lo que demuestra la capacidad de sensor y catalítica de hexosas a lo largo de la escala filogenética [6].

Hay diversas proteínas que se han implicado en la percepción o señalización por carbohidratos una de las vías de transducción de señales, es la vía independiente de la hexocinasa. Aunque también la detección y señalización de Glc independiente de HK podría involucrar receptores de superficie celular como sensores extracelulares, tal como la señalización regulada por la proteína G1 (RGS1). La señalización de Suc independiente de HK involucra a la cinasa SnRK1, el cual puede interactuar con T6P. Tanto FK como GalK han sido propuestas como sensores de azúcar adicionales a HK, como se sabe ocurre en el hepatocito [4].

Plantas de *Arabidopsis* con actividad AtHK1 incrementada redujeron su contenido de clorofila en hojas, reduciendo la fotosíntesis y reduciendo la eficiencia fotoquímica de los centros de reacción del fotosistema II. Adicionalmente, estas plantas se sometieron a una rápida senescencia, sugiriendo que la HK también está involucrada en la regulación de la senescencia. El contenido de almidón y los sólidos solubles totales en frutos maduros también fueron reducidos en plantas transgénicas. Lo anterior indica que la actividad endógena de HK no está limitada al crecimiento, esto

apoya que la HK cumple con una función como enzima regulatoria en tejidos fotosintéticos, en los cuales se regula la fotosíntesis, el crecimiento y la senescencia [5].

La muerte celular programada (PCD) es un proceso fundamental en plantas y animales. El proceso de muerte celular en animales es la apoptosis, altamente regulada por la autofagia (degradación lisosomal de organelos y ciertas proteínas) y la necrosis (provoca respuesta inflamatoria). Existe similitud entre la apoptosis en animales y PCD en plantas, por ejemplo, el citocromo C liberado de la mitocondria es un evento clave en la apoptosis y también ha sido observado en eventos tempranos en PCD. Interesante resulta el hecho de que previniendo la liberación del citocromo C mitocondrial se inhibe la apoptosis en células animales, de manera que está íntimamente ligada con la actividad HK de mitocondria. En células tumorales humanas, niveles elevados de HKI y HKII unidos a mitocondria previenen la apoptosis y permite la proliferación de las células [27].

Por lo anterior, es de esperar que el metabolismo de Glc juegue un papel fundamental en PCD, así como en otros procesos fisiológicos tanto en plantas como en animales y otros organismos [27].

La señalización de Glc, en muchos casos, requiere al menos, del metabolismo parcial del azúcar, además, un tema central en la elucidación del mecanismo de detección de Glc, es determinar si la función regulatoria de Glc puede ser separada de su función como nutriente [6].

El conocimiento de la distribución subcelular de HK en planta podría ayudar a elucidar los componentes en las vías de transducción de señales iniciadas por la fosforilación de fructosa y glucosa por la hexocinasa [11].

## ***JUSTIFICACIÓN***

En la germinación de semillas de maíz, las células presentan eventos metabólicos distintos, transitan de un estado seco (10-15% de agua) con alto contenido de reservas y baja actividad metabólica, hacia un estado hidratado y de cambios importantes. La hidratación durante la germinación modifica el contenido de varios metabolitos, sobre todo de carbohidratos. Adicionalmente, la eventual salida de la radícula y por tanto la conclusión de la germinación y la entrada a la etapa del desarrollo de la plántula, lleva consigo cambios en la expresión de genes que puede ser mediada por la percepción de la glucosa y su transducción. Por lo que el estudio de la hexocinasa en la germinación puede ayudar a entender como está proteína extiende la señal por carbohidratos [6, 28].

En nuestro laboratorio hallamos que la actividad de las hexocinasas citosólicas es baja durante la germinación, pero cuando se germinan ejes y embriones de maíz durante 24 en presencia de diferentes carbohidratos, se induce la expresión de isoenzimas distintas [29]. Lo anterior nos permite proponer que adicional a su capacidad regulatoria, las hexocinasas son susceptibles a ser reguladas a nivel transcripcional o traduccional por carbohidratos. Por lo que uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar que isoenzimas de hexocinasas tanto en citosol como en mitocondria cambiaban al embeber el tejido en concentraciones bajas o altas de glucosa o sacarosa.

Se conoce que en maíz hay actividad hexocinasa en citosol y también asociada a mitocondrias, sin embargo pese al estudiado a detalle de las características cinéticas de ambas hexocinasas [11, 13, 30], y que existen alrededor de 10 genes que codifican para hexocinasas en maíz [19], aún no hay reporte del total de enzimas que son capaces de fosforilar hexosas. Por lo que otro de los objetivos de este trabajo fue determinar el número de isoenzimas presentes en mitocondrias y citosol de diferentes tejidos de una planta de maíz. Por lo que encontrar las diferentes isoenzimas en maíz nos acercaría a encontrar la relevancia de las hexocinasas en los diferentes tejidos.

## ***HIPÓTESIS***

Siendo las hexocinasas importantes en el metabolismo y la señalización por carbohidratos, es factible encontrar en maíz alguna isoforma citosólica o mitocondrial de la hexocinasa que se encuentre regulada en actividad cuando el tejido ha sido embebido en carbohidratos.

## ***OBJETIVO GENERAL***

Identificar la ó las isoformas de hexocinasa de maíz que se regulan por la exposición del tejido vegetal a concentraciones y tipos diferentes de carbohidratos.

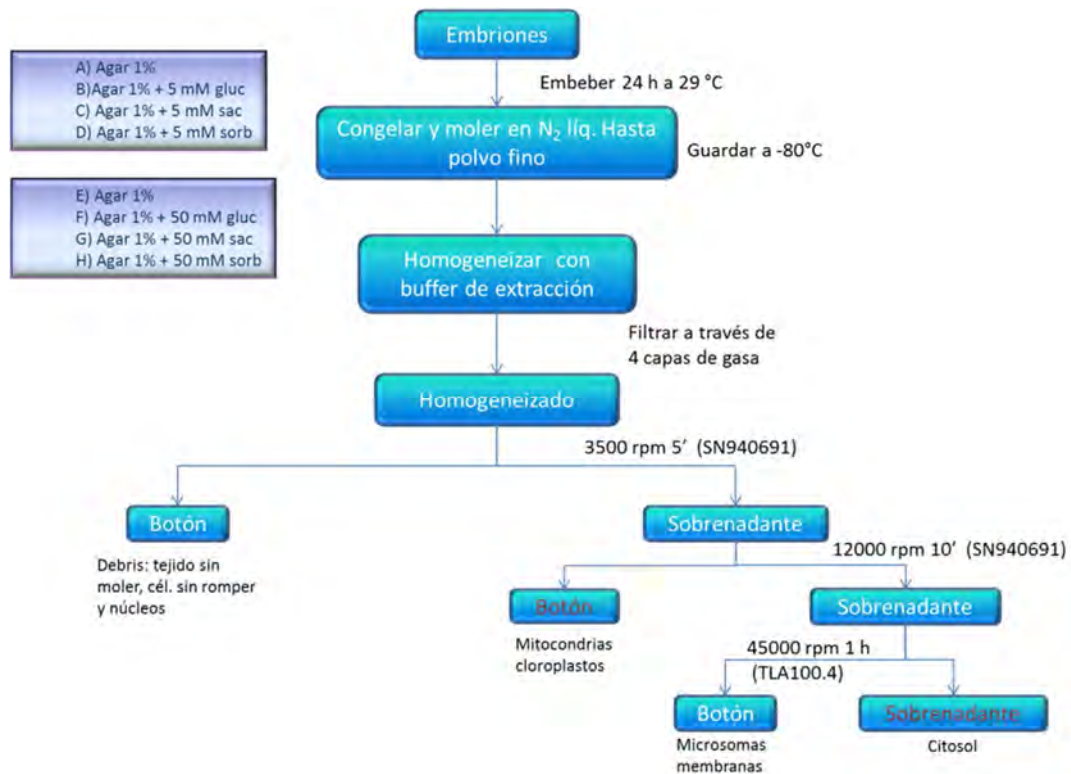
## ***Objetivos particulares***

1. Determinar el número y comparar las isoformas de hexocinasas citosólicas y mitocondriales de diferentes tejidos de una planta de maíz.
2. Evaluar el efecto de la incubación de embriones de maíz en concentraciones bajas o altas de glucosa y sacarosa sobre la actividad y número de hexocinasas mitocondriales y citosólicas de embriones de maíz.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## A. Diseño Experimental

El diseño experimental del presente trabajo se resume en la Figura 9. Para llevar a cabo la determinación del efecto de los carbohidratos glucosa y sacarosa sobre la actividad de hexocinasas de embriones de maíz, se colocaron a germinar embriones de maíz en dos diferentes concentraciones de estos carbohidratos, 5 y 50 mM y usando como controles de germinación los embriones incubados en agar y en el osmolito sorbitol. Debido a que la enzima puede tener una localización subcelular mitocondrial además de la citosólica, se obtuvo a la hexocinasa tanto en la fracción citosólica como en la mitocondrial y en ambas se determino su actividad tanto *in vitro* como en geles de poliacrilamida.



**Figura 9.** Esquema general de los tratamientos que recibieron los embriones de maíz y de la extracción de la hexocinasa. Primero se embebieron los embriones en agar en presencia o ausencia

de carbohidrato. Después de la incubación por 24 h se molieron los embriones y el polvo se homogeneizó y se sometió a una centrifugación diferencial para obtener las fracciones citosólica y la mitocondrial.

## ***B. Material Biológico.***

**Obtención de embriones.** Se disecaron manualmente los embriones de la semilla de maíz utilizando una navaja. Para cada tratamiento se utilizaron 2 g de embriones y se guardaron a 4°C hasta su uso.

**Germinación de embriones de maíz.** Los embriones se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 0.1% por 2 minutos, después se enjuagaron con agua estéril. En condiciones de esterilidad se sembraron 2 g de embriones de maíz en cajas Petri con agar al 1% adicionado con 5 o 50 mM de los carbohidratos glucosa, sacarosa o sorbitol. Las cajas se incubaron a 29 °C durante 24 h. Pasado el tiempo de incubación los embriones se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron en mortero hasta obtener un polvo fino, el cual se guardó a -80 °C hasta su uso.

**Planta completa.** Se obtuvo una planta completa de maíz de la cual se usaron la raíz, hoja, tallo y espiga para comparar la actividad e isoformas de la hexocinasa, con las observadas en los embriones de maíz. Se congelaron con N<sub>2</sub> líquido y se maceraron hasta obtener un polvo fino. Posteriormente las muestras de almacenaron a -80C hasta su uso.

## ***C. Extracción De La Hexocinasa.***

Se realizó el procedimiento descrito por Hernández-López (2007), realizando el procedimiento en frío, según se describe a continuación. Se homogeneizaron 2 g de polvo de embriones o de tejidos de planta adulta con amortiguador de homogeneización (50 mM de Hepes/KOH pH 7.0, 300 mM de sacarosa, 1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF y 2 mM de DTT, estos dos últimos se adicionaron justo antes

de usarse) utilizando un homogeneizador manual (Tissue tearor, 4000 rpm). El homogeneizado se filtró a través de 4 capas de gasa previamente humedecidas.

El filtrado se sometió a una centrifugación diferencial, la cual consistió en:

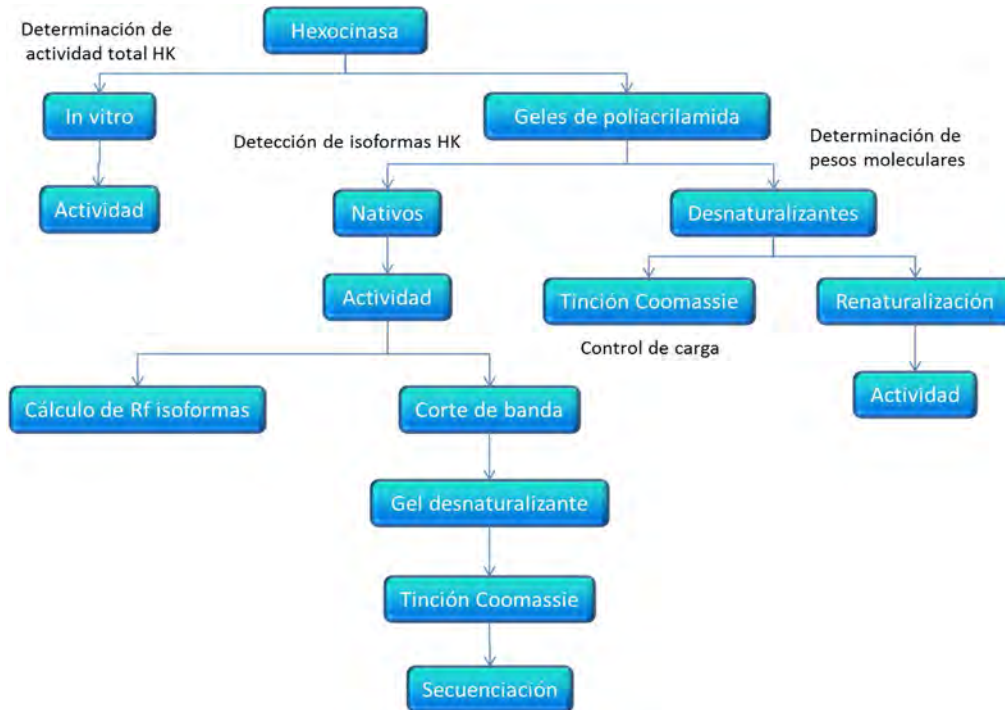
1. Centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos a 4 °C (Spectrafuge16 M, Labnet). El botón que corresponde al debris, es decir, tejido sin moler, células sin romper y núcleos se descartó.
2. El primer sobrenadante se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (Spectrafuge16 M, Labnet). El botón corresponde a **la fracción mitocondrial**, por lo que se resuspendió y se volvió a centrifugar a 12000 rpm y a resuspender nuevamente en 1 mL de amortiguador de homogeneización para su posterior almacenamiento en alícuotas de 350 µL.
3. El sobrenadante del paso anterior se centrifugó en una ultracentrífuga de mesa a 45000 rpm durante 1 hora a 4 °C (rotor TLA 100.4). El botón corresponde a la fracción microsomal, el cual se desechó. El primer sobrenadante, que es la **fracción citosólica**, se guardó en alícuotas de 200 µL en tubos Microfuga de 600 µL.
4. Para almacenar las fracciones mitocondrial y citosólica se le agregó glicerol a una concentración final de 10% y se alícuotaron previo a su almacenamiento a -80 °C. Se obtuvieron las fracciones mitocondriales y citosólicas de los embriones de tres replicas independientes.

#### ***D. Determinación De Proteína Por El Método De Bradford***

Las determinaciones de proteína se hicieron por triplicado para cada muestra utilizando el método de Bradford a microescala (BIO-RAD, cat: 500-0006), utilizando una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA). La descripción de la metodología se encuentra en el anexo III.

## E. Medición De La Actividad Hexocinasa in vitro

Una vez que se obtuvo la proteína, está se utilizó para determinar la actividad tanto *in vitro* como en geles de poliacrilamida-SDS, como se muestra en la Figura 10.



**Figura 10.** Protocolo de determinación de actividad de hexocinasa en las muestras de embriones. Los extractos de embriones ya sea citosólicos o mitocondriales fueron colocados en geles de poliacrilamida, tanto nativos como desnaturalizantes para determinar en el primero las isoformas de la hexocinasas presentes en la preparación y en los desnaturalizantes para determinar el peso molecular de las hexocinasas totales en la muestra.

Para la determinación de la actividad de hexocinasa se siguió el procedimiento reportado por Dai *et al.* 1999 y adaptado por Hernández-López, 2007. El ensayo de detección de la actividad de fosforilación de las hexosas (glucosa y fructosa) por las hexocinasas se realizó a través de un ensayo acoplado donde se registra la formación de NADPH según la siguiente reacción:





La reacción de medición de actividad de hexocinasa se llevó a cabo en un volumen final de 250  $\mu\text{L}$  en microplaca de 96 pozos tipo ELISA. La mezcla de reacción contuvo 60  $\mu\text{g}$  de proteína citosólica o 40  $\mu\text{g}$  mitocondrial, 2 mM de glucosa, fructosa o ambos, en ausencia o presencia de N-acetilglucosamina (NAG, concentración final 20 mM), 120  $\mu\text{L}$  de Reactivo de Ensayo de Glucosa (REG, SIGMA G3293). Cuando se utilizó la proteína mitocondrial se agregó ácido amino-caproico a una concentración final 200 mM y dodecilmaltósido a una concentración final de 4%. En el caso de los ensayos en los que el sustrato fue la fructosa se utilizó Fosfoglucosa isomerasa (SIGMA, cat: P5381-5KU) a una concentración final de 3.5 U/mL. La reacción se inició con la adición de los sustratos de la enzima, glucosa o fructosa. La reacción se condujo a temperatura ambiente. Se registró la absorbancia a 340 nm cada minuto durante 10 minutos. El ensayo se realizó por triplicado incluyendo el blanco que llevaba todo menos proteína.

A las absorbancias de las muestras se les resto la absorbancia del blanco, para cada punto se obtuvieron los promedios y la desviación estándar y se construyó la curva de absorbancia contra tiempo con estos datos. Se obtuvo la pendiente de la curva y se calculó la actividad de la enzima utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } (\mu\text{molmin}^{-1} \text{mg}^{-1}) = \frac{m * \text{vol} * 1000}{\epsilon * \text{proteína}}$$

Donde,

m es la pendiente de la curva ( $\text{min}^{-1}$ ),

$\epsilon$  es el coeficiente de absortividad molar del NADPH  $6.22 \times 10^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ,

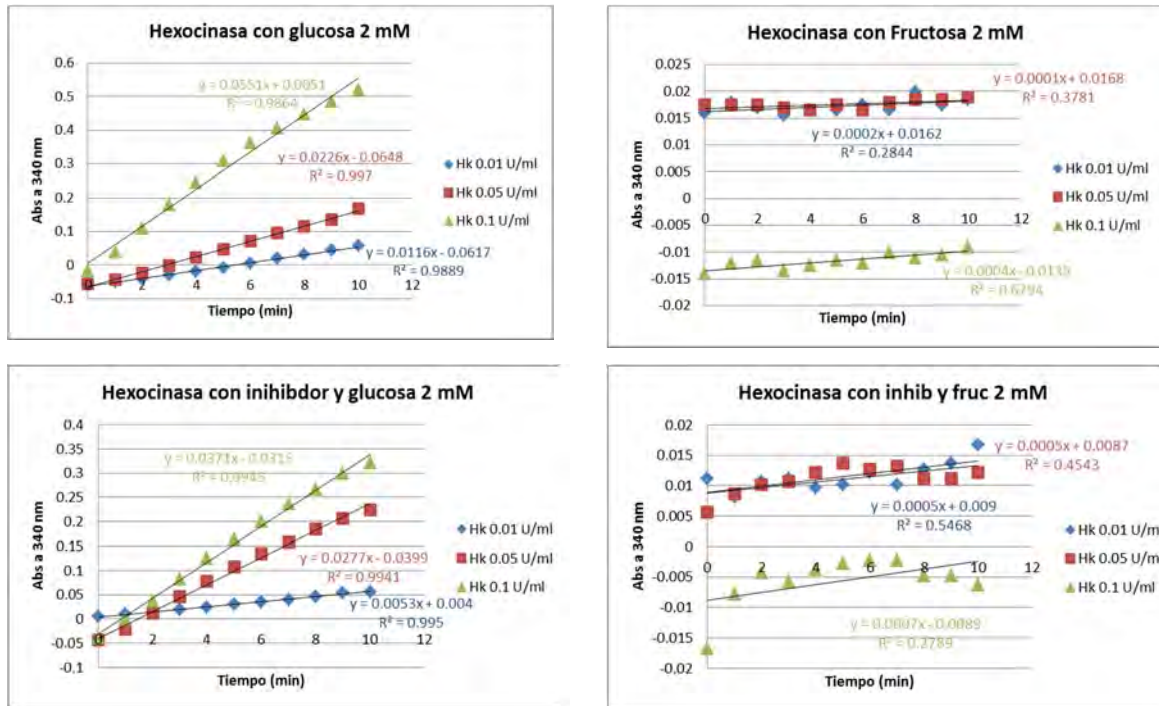
1000 para obtener unidades de  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

vol. corresponde al volumen tomado de la muestra en  $\mu\text{L}$

La proteína expresada en  $\mu\text{g}$

## Ensayo de actividad control de Hexocinasa.

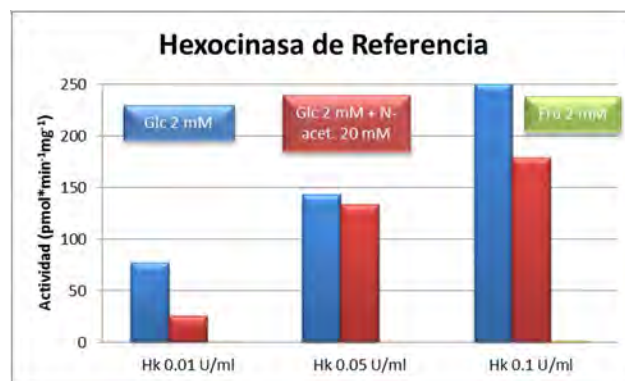
Para tener un control de la actividad de la enzima hexocinasa (HK) se hizo un ensayo con hexocinasa de ROCHE®. Los ensayos se hicieron utilizando como sustratos glucosa 2 mM y fructosa 2 mM. Se ensayaron tres distintas concentraciones de HK, siendo la de 0.1 U/mL la que presentó más actividad, seguida de la HK a 0.05 U/mL y 0.01 U/mL (Figuras 11A y B). Además como se observa la enzima de Roche prefiere usar como sustrato a la glucosa en lugar de la fructosa, las absorbancias con este último fueron muy bajas. Este comportamiento era el esperado y validaba nuestro método de medición de la enzima.



**Figura 11.** Curvas temporales de actividad de hexocinasa. Se registró la actividad de la enzima como el aumento en la absorbancia a 340 nm. Las gráficas 9 y 10 corresponden a los ensayos con glucosa como sustrato, en el caso de la gráfica 10, se usa inhibidor. La gráfica 11 son ensayos con fructosa como sustrato; la gráfica 12 además de fructosa se utilizó N-acetilglucosamina.

También se realizaron ensayos de medición de hexocinasa utilizando la enzima de Roche en presencia de la N-acetilglucosamina, conocido inhibidor de la enzima [31], a una concentración final 20 mM (Figura 11C y D). Encontramos que el inhibidor si disminuye la actividad de la enzima (Figura 11C).

Para el caso de la fructosa la enzima volvió a presentar una actividad menor, absorbancias menores que no cambiaron importantemente en presencia de la N-acetilglucosamina (Figura 11D).



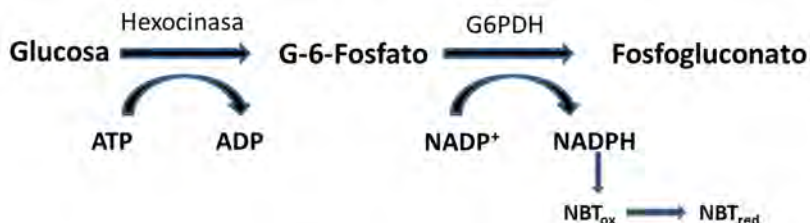
**Figura 12.** Actividad de hexocinasa en presencia de glucosa, fructosa y glucosa más inhibidor. Los valores de actividad se obtuvieron al realizar el cálculo utilizando las pendientes de las curvas mostradas en la Figura 11.

Los datos de absorbancia fueron convertidos a valores de actividad, con los cuales se construyeron las gráficas que se observan en la Figura 12. Se observa que la actividad de la hexocinasa en presencia de glucosa es de alrededor de 100 veces mayor que con fructosa y que el inhibidor glucosamina disminuye la actividad de la enzima cuando tiene como sustrato a la glucosa.

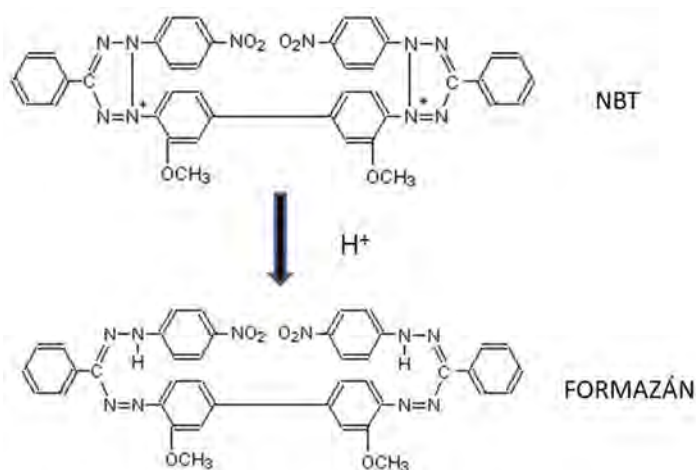
## F. Determinación De Actividad HK En Geles De Poliacrilamida Nativos Y Desnaturalizantes

Detección de actividad en geles de poliacrilamida nativos.

En este caso la actividad enzimática se midió en geles de poliacrilamida, siguiendo la misma reacción que en el caso de la medición de la actividad total. Para poder observar el producto final de la reacción se utilizó NBT el cuál se redujo y formó una sal de formazán siguiendo la reacción:



Esta es una reacción acoplada, en la que la enzima G6P deshidrogenasa remueve el hidruro del sustrato y lo transfiere al NAD<sup>+</sup> para formar NADH y de este modo, el NBT al tomar los protones, forma una sal de formazán insoluble y colorida en azul intenso (Figura 13; *Aldrich Chemical catalogue*, 1992).



**Figura 13.** Reacción de reducción del NBT por protones. El precipitado que se forma es una sal de formazán insoluble y colorida. (Tomado de <http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/nbt.htm>).

**Preparación de geles nativos.** Se prepararon geles de poliacrilamida de 0.75 mm de grosor al 12% para el gel separador y al 4% para el concentrador según se indica en la tabla 2.

Solución Stock	Gel separador (12%)	Gel concentrador (4%)
Acrilamida/Bisacrilamida 30:0.8	2mL	0.265mL
Tris/HCl 2M pH = 8.8	1.25mL	0.50 mL
Glicerol	1.0 mL	0.2 mL
H <sub>2</sub> O	0.75mL	1.035mL
Persulfato de amonio 10%*	40 µL	40 µL
TEMED*	5µL	5 µL

**Tabla 2.** Componentes y volúmenes utilizados para la preparación de geles de poliacrilamida nativo. \*Reactivos que se añadieron al último.

**Preparación de las muestras.** Se mezclaron los volúmenes necesarios para obtener de la fracción citosólica 60 µg y para la fracción mitocondrial 40 µg y se les adiciono amortiguador de muestra nativo (ver anexo II) en una relación 5 µL de amortiguador de muestra por cada 20 µL de proteína. Cuando se utilizaban las fracciones mitocondriales se les añadió también ácido aminocaproico a una concentración final de 20 mM y dodecilmaltósido a concentración final de 10%.

**Corrida del gel y detección de la actividad enzimática.** Los geles se corrieron en amortiguador de corrida nativo (Anexo II). Se inició la separación de proteínas a 150 V hasta llegar al límite entre el gel separador y el concentrador (aproximadamente 15 minutos) y después se continuó la corrida a 4°C a 80 V durante 20 horas.

Reactivo	Stock	Volumen agregado ( $\mu$ L)	Concentración final
Hepes/KOH pH = 7.8	500 mM	600	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	2.46 M	4.88	2 mM
EDTA	200 mM	30	1 mM
KCl	500 mM	180	15 mM
ATP	300 mM	20	2 mM
H <sub>2</sub> O	...	c.b.p. 6000	...

**Tabla 3.** Amortiguador de reacción. Sales y amortiguador utilizados en la mezcla de reacción para detectar actividad de hexocinasa

Al concluir la corrida se retiró el gel de las placas de vidrio y se le dio un prelavado, colocando el gel en un recipiente con 12 mL del amortiguador de reacción (tabla 3), se lavó con agitación constante por 20 minutos. Transcurrido el tiempo se desechó la solución y se agregaron 6 mL de la mezcla de reacción adicionada de sustrato. Los sustratos utilizados fueron: a) glucosa 2 mM, b) fructosa 2 mM, c) fructosa 150 mM y d) glucosa 2 mM + fructosa 30 mM y en algunos casos se añadió glucosamina junto con alguno de los carbohidratos sustratos para una concentración final de 20 mM (ver Tabla 4).

Reactivo	Stock	Volumen agregado ( $\mu$ L)	Concentración final
Hepes/KOH pH = 7.8	500 mM	600	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	2.46 M	4.88	2 mM
EDTA	200 mM	30	1 mM
KCl	500 mM	180	15 mM
ATP	300 mM	20	2 mM
Glucosa*	1 M	12	2 mM
Fructosa*	1 M	12	2 mM
Fructosa*	1 M	180	30 mM
Fructosa*	1 M	900	150 mM
N-acetilglucosamina**	500 mM	240	20 mM
H <sub>2</sub> O	...	c.b.p. 6000	...

**Tabla 4.** Mezcla de reacción con sustratos. En esta tabla se muestran los reactivos y volúmenes añadidos para detectar la actividad de la hexocinasa. \*Los carbohidratos fueron adicionados solos o en conjunto para detectar la actividad de las glucocinasas, fructocinasas o hexocinasas. \*\* El

inhibidor de la actividad de hexocinasas se añadió solo en los casos en los que se indican en las figuras de resultados.

Una vez con el sustrato el gel se agitó suavemente con agitación rotatoria por 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se agregó a la mezcla 1.5 mL de REG y se dejó agitando a temperatura ambiente por 25 minutos. Posteriormente se agregó con la punta de una espátula pequeña NBT (Nitroblue tetrazolium, BIO-RAD® cat: 170-6532) en polvo (aproximadamente 0.25 mg por cada mL de reacción) y se agitó suavemente con la mano para disolver el NBT (la cantidad de NBT debe ser suficiente para que la solución que baña el gel presente una coloración amarillo pardo). Se incubó a 37 °C entre 15 minutos y 40 minutos hasta que las zonas del gel donde se encuentra la enzima hexocinasa son visibles. Para fijar el gel se reemplazó la mezcla de reacción por ácido acético al 10%. Se fotografiaron los geles y se secaron entre dos hojas de celofán.

Los geles fueron analizados y se obtuvo el valor de Rf para cada una de las bandas que presentaron actividad de hexocinasa.

*Detección de actividad en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE).*

**Preparación de geles desnaturalizantes.** Los geles con un grosor de 0.75 mm se prepararon al 12%

Solución Stock	Gel separador (12%)	Gel concentrador (4%)
Acrilamida/Bisacrilamida 30:0.8	4 mL	0.66 mL
Tris/HCl 2M pH = 8.8	2 mL	0.60 mL
SDS 20%	50 µL	25 µL
H <sub>2</sub> O	3.888 mL	3.672 mL
APS 10%*	80 µL	80 µL
TEMED*	10 µL	10 µL

**Tabla 5.** Reactivos y volúmenes utilizados para preparar un gel de poliacrilamida-SDS. Primero se preparó el gel separados y después el concentrador. Se agregaron los reactivos en el

orden indicado.\* Estos dos reactivos se añadieron justo antes de vaciarse entre las placas de vidrio.

**Preparación de las muestras.** Se mezclaron los volúmenes necesarios para obtener de la fracción citosólica 60  $\mu\text{g}$  y para la fracción mitocondrial 40  $\mu\text{g}$  y se les adiciono amortiguador de muestra desnaturizante (ver anexo II), se mezclaron 5  $\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular para proteína con 20  $\mu\text{L}$  de amortiguador de muestra (BIORAD 16-0374).

**Corrida del gel y detección de actividad enzimática.** Las muestras se colocaron en los pozos y se corrió el gel a 15 mA hasta llegar al límite entre el gel separador y el concentrador (aproximadamente 40 minutos) y después se corrió a 25 mA hasta que el colorante saliera del gel (aproximadamente 1 hora con 20 minutos).

Una vez que terminó la corrida el gel se retiró de las placas de vidrio y el gel se usó ya sea para medir actividad de las hexocinasas o el teñido de las proteínas. Para la tinción del gel se colocó en un recipiente con solución teñidora (ver soluciones en el anexo II), se dejó en agitación constante por al menos 1 h y después se cambió la solución teñidora por solución desteñidora. Para fijar el gel se reemplazó la solución desteñidora por ácido acético al 10%. Se fotografiaron los geles y se secaron entre dos hojas de celofán.

**Detección de la actividad de la enzima en el gel SDS-PAGE.** Una vez concluida la corrida el gel se colocó en un recipiente con 0.1 M Tris pH = 7.6, para lavar el SDS del gel y se agitó por 15 minutos, se repitió el proceso tres veces más, pero los dos últimos lavados fueron de 30 min cada uno. Posteriormente se continuo con el protocolo para la detección de actividad descrito en la sección de los geles nativos de actividad, es decir, se hizo un prelavado con la mezcla de sustrato sin sustrato y posteriormente se incubó el gel con sustrato, se añadió el reactivo de glucosa y se reveló con NBT para posteriormente fijar con ácido acético al 10% y tomar la foto del gel.



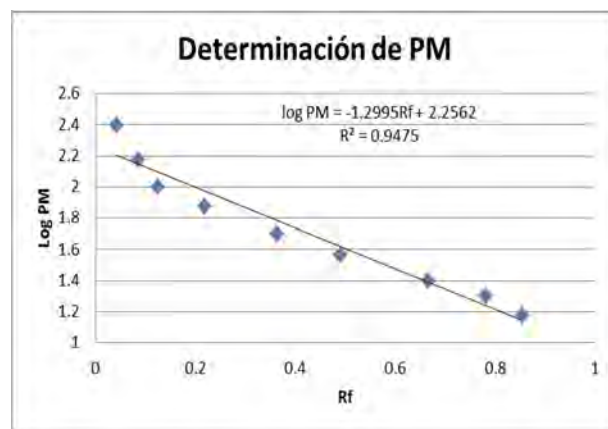
## **G. Determinación de pesos moleculares y Rf de las isoenzimas HK en geles de poliacrilamida**

### *Curva patrón de PM*

Para poder determinar el peso molecular de la enzima hexocinasa primero se realizó una gráfica de log PM vs Rf. Los valores de Rf y peso molecular se tomaron de las muestras corridas en PAGE-SDS del marcador de peso molecular para proteínas (Precision Plus Protein standard dual color, BIO-RAD® 161-0374). De la curva obtenida se realizó la regresión lineal de los datos y con la ecuación de la recta se calcularon los pesos moleculares de las isoformas HK en las muestras de embriones y de la planta completa en los geles desnaturalizantes.

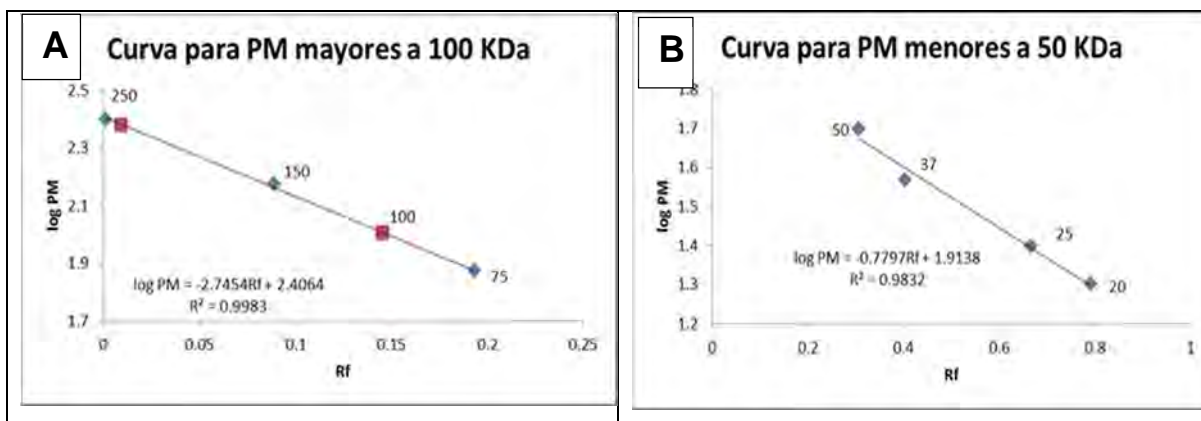
PM	log PM	Rf
15	1.17609126	0.8541
20	1.30103	0.7812
25	1.39794001	0.6666
37	1.56820172	0.4895
50	1.69897	0.3645
75	1.87506126	0.2185
100	2	0.125
150	2.17609126	0.0865
250	2.39794001	0.0416

**Tabla 6.** Valores de PM y de Rf del marcador de peso molecular (BIO-RAD®).



**Figura 14.** Curva estándar de peso molecular en gel de poliacrilamida-SDS.

Como la curva no es claramente lineal para los valores de peso molecular en los extremos, es necesario realizar las gráficas para los valores de peso molecular alto y bajo:



**Figura 15.** Curvas de estándar de peso molecular. A. Gráfica de corrimiento en geles de poliácridamida de estándares de peso molecular mayores a 100 KDa y B. de estándares de peso molecular menor a 50 KDa.

Datos de PM para las muestras de planta completa en PAGE-SDS

Sustrato		Glucosa 2 mM												
Citosol	Muestra	Raíz		Tallo		Hoja		Espiga		Agar 5 mM		Agar 50 mM		
	Isoformas	2		2		2		2		2		2		
	Rf	0.1694	0.3064	0.1693	0.3064	0.1854	0.3064	0.1935	0.2903	0.16	0.3387	0.16	0.3387	
	PM	108.67	47.29	108.67	47.29	103.55	47.29	101.08	48.69	111.76	44.64	111.76	44.64	
	Sustrato		Fructosa 2 mM											
	Muestra	Raíz		Tallo		Hoja		Espiga		Agar 5 mM		Agar 50 mM		
	Isoformas	2		2		2		1		2		2		
	Rf	0.19	0.3359	0.19	0.3359	....	0.3359	0.1953	....	0.17	0.34	0.17	0.34	
	PM	102.16	44.86	102.16	44.86	....	44.86	100.55	....	108.46	44.53	108.46	44.53	
	Sustrato		Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM											
	Muestra	Raíz		Tallo		Hoja		Espiga		Agar 5 mM		Agar 50 mM		
	Isoformas	2		2		1		2		2		2		
	Rf	0.16	0.33	0.16	0.33	....	0.33	0.22	...	0.16	0.33	0.16	0.33	
	PM	111.76	45.34	111.76	45.34	....	45.34	93.39	....	111.76	45.34	111.76	45.34	

**Tabla 7.** En esta tabla se presentan los datos de Rf y peso molecular, en KDa, de las muestras de planta completa. Se observan entre 1 y 2 isoformas de la enzima, la primera mayor a 100 KDa y la menor de alrededor de los 60 KDa. En este ensayo se agregaron las muestras control de los embriones, los cuales solo fueron sembrados en agar al 1%, Agar 1 corresponde a los embriones empleados para los tratamientos de con carbohidrato a una concentración 5 mM y las muestras de Agar 2 son las correspondientes a los embriones sembrados en tratamiento con carbohidrato a 50 mM. Estas muestras son de la fracción citosólica.

<b>Mitochondria</b>	Sustrato		Glucosa 2 mM										
	<b>Muestra</b>	<i>Raíz</i>	<i>Tallo</i>		<i>Hoja</i>		<i>Espiga</i>		<i>Agar 1</i>		<i>Agar 2</i>		
	<b>Isoforma</b>	2	2		2		2		2		2		
	<b>Rf</b>	0.0072	0.1522	0.0072	0.1522	0.0072	0.1522	0.0072	0.1522	0.0072	0.1522	0.0072	0.1522
	<b>PM</b>	243.56	114.41	243.56	114.41	243.56	114.41	243.56	114.41	243.56	114.41	243.56	114.41
	<b>Sustrato</b>		Fructosa 2 mM										
	<b>Muestra</b>	<i>Raíz</i>	<i>Tallo</i>		<i>Hoja</i>		<i>Espiga</i>		<i>Agar 1</i>		<i>Agar 2</i>		
	<b>Isoforma</b>	2	2		2		2		2		2		
	<b>Rf</b>	0.0076	0.1538	0.0076	0.1538	0.0076	0.1538	0.0076	0.1538	0.0076	0.1538	0.0076	0.1538
	<b>PM</b>	242.81	113.84	242.81	113.84	242.81	113.84	242.81	113.84	242.81	113.84	242.81	113.84
	<b>Sustrato</b>		Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM										
	<b>Muestra</b>	<i>Raíz</i>	<i>Tallo</i>		<i>Hoja</i>		<i>Espiga</i>		<i>Agar 1</i>		<i>Agar 2</i>		
	<b>Isoforma</b>	2	2		2		2		2		2		
	<b>Rf</b>	0.0076	0.1538	0.0076	0.1538	0.0076	0.1538	0.0076	0.1538	0.0076	0.1538	0.0076	0.1538
<b>PM</b>	242.81	113.84	242.81	113.84	242.81	113.84	242.81	113.84	242.81	113.84	242.81	113.84	

**Tabla 8.** En esta tabla se muestran los valores de PM y Rf de las muestras de planta de la fracción mitocondrial. En varios de los carriles de los geles no se alcanzó a apreciar bandas, como en el caso de raíz, hoja y espiga del gel con Glc 2 mM como sustrato; por esta razón no hay valores en estas columnas. En las muestras en las que se observan bandas, los pesos moleculares de la primera banda son superiores a 100 KDa y los de la segunda banda son superiores a 70 KDa.

Citosol	Sustrato		Glucosa 2 mM																											
	<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>	<i>Sorb 5 mM</i>				<i>Glc 5 mM</i>				<i>Suc 5 mM</i>				<i>Agar</i>				<i>Sorb 50 mM</i>				<i>Glc 50 mM</i>				<i>Suc 50 mM</i>			
	<b>Isoforma</b>	2	2				2				2				2				2				2							
	<b>Rf</b>	0.146	0.4	0.146	0.4	0.146	0.4	0.146	0.4	0.146	0.4	0.146	0.4	0.146	0.4	0.146	0.4	0.146	0.4	0.146	0.4	0.146	0.4	0.146	0.4	0.146	0.4			
	<b>PM</b>	116.2	39.99	116.2	39.99	116.2	39.99	116.2	39.99	116.2	39.99	116.2	39.99	116.2	39.99	116.2	39.99	116.2	39.99	116.2	39.99	116.2	39.99	116.2	39.99	116.2	39.99			
	<b>Sustrato</b>		<b>Fructosa 2 mM</b>																											
	<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>	<i>Sorb 5 mM</i>				<i>Glc 5 mM</i>				<i>Suc 5 mM</i>				<i>Agar</i>				<i>Sorb 50 mM</i>				<i>Glc 50 mM</i>				<i>Suc 50 mM</i>			
	<b>Isoforma</b>	2	2				2				2				2				2				2							
	<b>Rf</b>	0.1444	0.3555	0.1444	0.3555	0.1444	0.3555	0.1444	0.3555	0.1444	0.3555	0.1444	0.3555	0.1444	0.3555	0.1444	0.3555	0.1444	0.3555	0.1444	0.3555	0.1444	0.3555	0.1444	0.3555	0.1444	0.3555			
	<b>PM</b>	117.08	43.31	117.08	43.31	117.08	43.31	117.08	43.31	117.08	43.31	117.08	43.31	117.08	43.31	117.08	43.31	117.08	43.31	117.08	43.31	117.08	43.31	117.08	43.31	117.08	43.31			
	<b>Sustrato</b>		<b>Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM</b>																											
	<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>	<i>Sorb 5 mM</i>				<i>Glc 5 mM</i>				<i>Suc 5 mM</i>				<i>Agar</i>				<i>Sorb 50 mM</i>				<i>Glc 50 mM</i>				<i>Suc 50 mM</i>			
	<b>Isoforma</b>	2	2				2				2				2				2				2							
	<b>Rf</b>	0.1538	0.3678	0.1538	0.3678	0.1538	0.3678	0.1538	0.3678	0.1538	0.3678	0.1538	0.3678	0.1538	0.3678	0.1538	0.3678	0.1538	0.3678	0.1538	0.3678	0.1538	0.3678	0.1538	0.3678	0.1538	0.3678			
	<b>PM</b>	113.85	42.36	113.85	42.36	113.85	42.36	113.85	42.36	113.85	42.36	113.85	42.36	113.85	42.36	113.85	42.36	113.85	42.36	113.85	42.36	113.85	42.36	113.85	42.36	113.85	42.36			

**Tabla 9.** Muestras de la fracción citosólica de las muestras de embriones sembrados en carbohidrato a concentración 5 mM y 50 mM. En todos los ensayos realizados tanto con Glc como con Fructosa como sustrato se observa una sola banda con un peso molecular de alrededor de 120 KDa.

Mitochondria		Sustrato		Glucosa 2 mM														
		<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>		<i>Sorb 5 mM</i>		<i>Glc 5 mM</i>		<i>Suc 5 mM</i>		<i>Agar</i>		<i>Sorb 50 mM</i>		<i>Glc 50 mM</i>		<i>Suc 50 mM</i>	
		<b>Isoforma</b>	2		2		2		2		2		2		2		2	
		<b>Rf</b>	0.040	0.104	0.040	0.104	0.040	0.104	0.040	0.104	0.028	0.105	0.028	0.105	0.028	0.105	0.028	0.105
		<b>PM</b>	197.5	131.8	197.5	131.8	197.5	131.8	197.5	131.8	212.4	131.4	212.4	131.4	212.4	131.4	212.4	131.4
		<b>Sustrato</b>		<b>Fructosa 2 mM</b>														
		<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>		<i>Sorb 5 mM</i>		<i>Glc 5 mM</i>		<i>Suc 5 mM</i>		<i>Agar</i>		<i>Sorb 50 mM</i>		<i>Glc 50 mM</i>		<i>Suc 50 mM</i>	
		<b>Isoforma</b>	2		2		2		2		2		2		2		2	
		<b>Rf</b>	0.0278	0.1023	0.0278	0.1023	0.0278	0.1023	0.0278	0.1023	0.0278	0.1023	0.0278	0.1023	0.0278	0.1023	0.0278	0.1023
		<b>PM</b>	213.86	132.82	213.86	132.82	213.86	132.82	213.86	132.82	213.86	132.82	213.86	132.82	213.86	132.82	213.86	132.82
<b>Sustrato</b>		<b>Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM</b>																
<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>		<i>Sorb 5 mM</i>		<i>Glc 5 mM</i>		<i>Suc 5 mM</i>		<i>Agar</i>		<i>Sorb 50 mM</i>		<i>Glc 50 mM</i>		<i>Suc 50 mM</i>			
<b>Isoforma</b>	2		2		2		2		2		2		2		2			
<b>Rf</b>	0.028	0.1111	0.028	0.1111	0.028	0.1111	0.028	0.1111	0.028	0.1111	0.028	0.1111	0.028	0.1111	0.028	0.1111		
<b>PM</b>	213.51	129.37	213.51	129.37	213.51	129.37	213.51	129.37	213.51	129.37	213.51	129.37	213.51	129.37	213.51	129.37		

**Tabla 10.** Muestras mitocondriales de las muestras de embriones de maíz sembrados en carbohidratos a concentración 5 y 50 mM. En estas muestras se observan dos bandas, la primera es superior a 160 KDa y la segunda mayor a 130 KDa. A comparación de las muestras citosólicas, las isoformas mitocondriales tienen un peso molecular más elevado.

*Rf de las isoformas HK en geles nativos de poliacrilamida.*

En estos geles solo se determinó el valor de Rf para cada banda correspondiente a cada isoforma HK que aparece en cada muestra.

Sustrato		Glucosa 2 mM													
Muestra	Raíz	Tallo					Hoja			Espiga					
Isoformas	3	5					3			2					
Rf	0.0202	0.1313	0.3434	0.0202	0.1313	0.1515	0.2828	0.3434	0.0202	0.1313	0.3434	....	0.1313	0.3434	
Sustrato		Fructosa 2 mM													
Muestra	Raíz	Tallo					Hoja			Espiga					
Isoformas	3	4					2			3					
Rf	0.0202	0.1313	0.3434	0.0202	0.1313	0.1515	0.3434	0.0202	0.3434	....	0.1313	0.2828	0.3434	....	
Sustrato		Fructosa 150 mM													
Muestra	Raíz	Tallo					Hoja			Espiga					
Isoformas	3	5					4			2					
Rf	0.0202	0.1313	0.3434	0.0202	0.1313	0.2121	0.2424	0.3434	0.0202	0.1313	0.1515	0.3434	0.1515	0.3434	
Sustrato		Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM													
Muestra	Raíz	Tallo					Hoja			Espiga					
Isoformas	3	4					4			2					
Rf	0.0202	0.1313	0.3434	0.0202	0.1313	0.1515	0.3434	0.0202	0.1313	0.1515	0.3434	0.1313	0.3434	....	

**Tabla 11.** En esta tabla solo se presenta el valor de Rf puesto que las muestras corrieron en condiciones nativas. Se presentaron diferentes isoformas en cada una de las muestras de plantas y dependiendo del sustrato en el ensayo se expresaron isoformas distintas de la enzima, teniendo así, para raíz solo tres isoformas, en tallo hubieron cuatro isoformas en los ensayos con fructosa 2 mM y Glc 2 mM + Fru 30 mM como sustrato y cinco isoformas con Glc 2 mM y Fru 150 mM como sustrato. Las muestras de hoja presentaron tres isoformas en el ensayo con Glc 2 mM como sustrato, dos isoformas con Fru 2 mM y cuatro isoformas con Fru 150 mM y Glc 2 mM + Fru 30 mM. Finalmente, en las muestras de espiga, hay dos isoformas en todas las muestras, excepto en la que se utilizó Fru 2 mM como sustrato, en la que aparecen dos isoformas.

	Sustrato		Glucosa 2 mM														
	<b>Muestra</b>	<i>Raíz</i>	<i>Tallo</i>						<i>Hoja</i>				<i>Espiga</i>				
	<b>Isoformas</b>	3	5						4				4				
	<b>Rf</b>	0.007	0.034	0.318	0.007	0.034	0.101	0.176	0.318	0.007	0.034	0.101	0.318	0.007	0.034	0.176	0.318
	Sustrato		Fructosa 2 mM														
	<b>Muestra</b>	<i>Raíz</i>	<i>Tallo</i>						<i>Hoja</i>				<i>Espiga</i>				
	<b>Isoformas</b>	3	5						4				4				
	<b>Rf</b>	0.007	0.049	0.361	0.007	0.049	0.125	0.188	0.361	0.007	0.049	0.125	0.361	0.007	0.049	0.188	0.361
	Sustrato		Fructosa 150 mM														
	<b>Muestra</b>	<i>Raíz</i>	<i>Tallo</i>						<i>Hoja</i>				<i>Espiga</i>				
	<b>Isoformas</b>	3	5						3				4				
	<b>Rf</b>	0.007	0.041	0.372	0.007	0.041	0.115	0.182	0.372	0.007	0.041	0.115	....	0.007	0.041	0.182	0.372
	Sustrato		Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM														
	<b>Muestra</b>	<i>Raíz</i>	<i>Tallo</i>						<i>Hoja</i>				<i>Espiga</i>				
	<b>Isoformas</b>	3	5						4				4				
	<b>Rf</b>	0.006	0.039	0.409	0.006	0.039	0.115	0.179	0.409	0.006	0.039	0.115	0.409	0.006	0.039	0.179	0.409

Mitocondria

**Tabla 12.** Muestras mitocondriales de planta. En estos ensayos se observaron solamente 3 isoformas de la enzima HK en todas las partes de la planta con Rf muy parecidos entre ellos.



Citosol	<b>Sustrato</b>	<b>Glucosa 2 mM</b>											
	<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>						<i>Sorb 5 mM</i>					
	<b>Isoformas</b>	6						6					
	<b>Rf</b>	0.0094	0.0471	0.0566	0.1415	0.1886	0.3113	0.0094	0.0471	0.0566	0.1415	0.1886	0.3113
	<b>Sustrato</b>	<b>Glucosa 2 mM</b>											
	<b>Muestra</b>	<i>Glc 5 mM</i>						<i>Suc 5 mM</i>					
	<b>Isoformas</b>	6						6					
	<b>Rf</b>	0.0094	0.0471	0.0566	0.1415	0.1886	0.3113	0.0094	0.0471	0.0566	0.1415	0.1886	0.3113
	<b>Sustrato</b>	<b>Fructosa 2 mM</b>											
	<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>						<i>Sorb 5 mM</i>					
	<b>Isoformas</b>	6						6					
	<b>Rf</b>	0.0188	0.0377	0.0754	0.1603	0.1981	0.3113	0.0188	0.0377	0.0754	0.1603	0.1981	0.3113
	<b>Sustrato</b>	<b>Fructosa 2 mM</b>											
	<b>Muestra</b>	<i>Glc 5 mM</i>						<i>Suc 5 mM</i>					
	<b>Isoformas</b>	6						6					
	<b>Rf</b>	0.0188	0.0377	0.0754	0.1603	0.1981	0.3113	0.0188	0.0377	0.0754	0.1603	0.1981	0.3113
<b>Sustrato</b>	<b>Fructosa 150 mM</b>												
<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>						<i>Sorb 5 mM</i>						
<b>Isoformas</b>	6						6						
<b>Rf</b>	0.0188	0.0377	0.0754	0.1603	0.1981	0.3113	0.0188	0.0377	0.0754	0.1603	0.1981	0.3113	
<b>Sustrato</b>	<b>Fructosa 150 mM</b>												
<b>Muestra</b>	<i>Glc 5 mM</i>						<i>Suc 5 mM</i>						
<b>Isoformas</b>	6						6						
<b>Rf</b>	0.0188	0.0377	0.0754	0.1603	0.1981	0.3113	0.0188	0.0377	0.0754	0.1603	0.1981	0.3113	
<b>Sustrato</b>	<b>Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM</b>												
<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>						<i>Sorb 5 mM</i>						
<b>Isoformas</b>	5						5						

<b>Rf</b>	0.0094	0.0566	0.1445	0.1886	0.3113	....	0.0094	0.0566	0.1445	0.1886	0.3113	....
<b>Sustrato</b>	<b>Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM</b>											
<b>Muestra</b>	<i>Glc 5 mM</i>						<i>Suc 5 mM</i>					
<b>Isoformas</b>	5						5					
<b>Rf</b>	0.0094	0.0566	0.1445	0.1886	0.3113	....	0.0094	0.0566	0.1445	0.1886	0.3113	....

**Tabla 13.** Rf de las isoformas en muestras citosólicas de embriones sembrados en carbohidrato a concentración de 5 mM. En la mayoría de las muestras se observan 6 isoformas, aunque también se identificaron algunas muestras que sólo presentaron 5 isoformas, dependiendo del sustrato utilizado en el ensayo de actividad en el gel.

Mitochondria	Sustrato																				
	Glucosa 2 mM																				
	<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>					<i>Sorb 5 mM</i>					<i>Glc 5 mM</i>					<i>Suc 5 mM</i>				
	<b>Isoformas</b>	5					5					5					5				
	<b>Rf</b>	0.006	0.019	0.043	0.08	0.185	0.006	0.019	0.043	0.08	0.185	0.006	0.019	0.043	0.08	0.185	0.006	0.019	0.043	0.08	0.185
	Sustrato																				
	Fructosa 2 mM																				
	<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>					<i>Sorb 5 mM</i>					<i>Glc 5 mM</i>					<i>Suc 5 mM</i>				
	<b>Isoformas</b>	5					5					5					5				
	<b>Rf</b>	0.006	0.019	0.056	0.081	0.219	0.006	0.019	0.056	0.08	0.219	0.006	0.019	0.056	0.081	0.219	0.006	0.019	0.056	0.081	0.219
	Sustrato																				
	Fructosa 150 mM																				
	<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>					<i>Sorb 5 mM</i>					<i>Glc 5 mM</i>					<i>Suc 5 mM</i>				
	<b>Isoformas</b>	5					5					5					5				
	<b>Rf</b>	0.011	0.028	0.061	0.106	0.328	0.011	0.028	0.061	0.11	0.328	0.011	0.028	0.061	0.106	0.328	0.011	0.028	0.061	0.106	0.328
Sustrato																					
Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM																					
<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>					<i>Sorb 5 mM</i>					<i>Glc 5 mM</i>					<i>Suc 5 mM</i>					
<b>Isoformas</b>	5					5					5					5					
<b>Rf</b>	0.006	0.024	0.053	0.094	0.247	0.006	0.024	0.053	0.09	0.247	0.006	0.024	0.053	0.094	0.247	0.006	0.024	0.053	0.094	0.247	

**Tabla 14.** Rf de las isoformas de la fracción mitocondrial de embriones de maíz. Todas las muestras presentaron cuatro isoformas con Rf muy similares entre isoformas.

	Sustrato										Glucosa 2 mM												
	<i>Agar</i>				<i>Sorb 50 mM</i>						<i>Glc 50 mM</i>					<i>Suc 50 mM</i>							
	4				6						6					6							
	<b>Rf</b>	0.009	0.047	0.189	0.311	0.009	0.047	0.057	0.142	0.189	0.311	0.009	0.047	0.057	0.142	0.189	0.311	0.009	0.047	0.057	0.142	0.189	0.311
	Sustrato										Fructosa 2 mM												
	<i>Agar</i>				<i>Sorb 50 mM</i>						<i>Glc 50 mM</i>					<i>Suc 50 mM</i>							
	4				6						6					6							
	<b>Rf</b>	0.019	0.16	0.198	0.311	0.009	0.047	0.057	0.142	0.189	0.311	0.009	0.047	0.057	0.142	0.189	0.311	0.009	0.047	0.057	0.142	0.189	0.311
	Sustrato										Fructosa 150 mM												
	<i>Agar</i>				<i>Sorb 50 mM</i>						<i>Glc 50 mM</i>					<i>Suc 50 mM</i>							
	4				6						6					6							
	<b>Rf</b>	0.019	0.16	0.198	0.311	0.009	0.047	0.057	0.142	0.189	0.311	0.009	0.047	0.057	0.142	0.189	0.311	0.009	0.047	0.057	0.142	0.189	0.311
	Sustrato										Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM												
	<i>Agar</i>				<i>Sorb 50 mM</i>						<i>Glc 50 mM</i>					<i>Suc 50 mM</i>							
	4				6						6					6							
	<b>Rf</b>	0.009	0.142	0.189	0.311	0.009	0.047	0.057	0.142	0.189	0.311	0.009	0.047	0.057	0.142	0.189	0.311	0.009	0.047	0.057	0.142	0.189	0.311

Citosol

**Tabla 15.** Rf de las isoformas de HK citosólica de embriones sembrados en carbohidrato a concentración 50 mM. Al igual que en los embriones sembrados en carbohidrato 5 mM, se observan hasta 6 isoenzimas, teniendo Rf's muy similares entre isoformas.

	<b>Sustrato</b>					<b>Glucosa 2 mM</b>															
	<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>					<i>Sorb 50 mM</i>					<i>Glc 50 mM</i>					<i>Suc 50 mM</i>				
	<b>Isoformas</b>	5					5					5					5				
	<b>Rf</b>	0.006	0.019	0.043	0.08	0.185	0.006	0.019	0.043	0.08	0.185	0.006	0.019	0.043	0.08	0.185	0.006	0.019	0.043	0.08	0.185
	<b>Sustrato</b>					<b>Fructosa 2 mM</b>															
	<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>					<i>Sorb 50 mM</i>					<i>Glc 50 mM</i>					<i>Suc 50 mM</i>				
	<b>Isoformas</b>	5					5					5					5				
	<b>Rf</b>	0.006	0.019	0.056	0.081	0.219	0.006	0.019	0.056	0.081	0.219	0.006	0.019	0.056	0.081	0.219	0.006	0.019	0.056	0.081	0.219
	<b>Sustrato</b>					<b>Fructosa 150 mM</b>															
	<b>Muestra</b>	<i>Agar 50 mM</i>					<i>Sorb 50 mM</i>					<i>Glc 50 mM</i>					<i>Suc 50 mM</i>				
	<b>Isoformas</b>	5					5					5					5				
	<b>Rf</b>	0.011	0.028	0.061	0.106	0.328	0.011	0.028	0.061	0.106	0.328	0.011	0.028	0.061	0.106	0.328	0.011	0.028	0.061	0.106	0.328
	<b>Sustrato</b>					<b>Glucosa 2 mM + Fructosa 30 mM</b>															
	<b>Muestra</b>	<i>Agar</i>					<i>Sorb 50 mM</i>					<i>Glc 50 mM</i>					<i>Suc 50 mM</i>				
	<b>Isoformas</b>	5					5					5					5				
	<b>Rf</b>	0.006	0.024	0.053	0.094	0.247	0.006	0.024	0.053	0.094	0.247	0.006	0.024	0.053	0.094	0.247	0.006	0.024	0.053	0.094	0.247

Mitocondria

**Tabla 16.** Isoenzimas en las muestras de la fracción mitocondrial en embriones de maíz. Se observaron cuatro isoformas en los distintos tratamientos y ensayos con Fru y Glc como sustrato. Los valores de Rf son idénticos entre isoformas.

## ***H. Secuenciación De Las Isoformas De La Hexocinasa De Maíz***

Para conocer en que se diferenciaban cada una de las isoformas de la hexocinasa, se decidió enviar a secuenciar a cada una de las proteínas, para lograr el objetivo se prepararon geles nativos de poliacrilamida, se cargaron 10 pozos cada uno con 60 µg de proteína de la fracción citosólica de embriones que fueron embebidos en agar con glucosa 50 mM. En otro gel se cargaron 40 µg de proteína de la fracción mitocondrial de los embriones embebidos en agar con glucosa 50 mM, también en los 10 carriles del gel.

Una vez que terminaron de correr los geles se separaron de las placas de vidrio, se cortó uno de los carriles de cada gel, se guardó el resto del gel se guardó en amortiguador de corrida a 4 °C (9 carriles). En el carril cortado de cada gel se procedió de acuerdo al protocolo para los geles nativos, incubando en sustrato y relevando con NBT. Cuando las tiras de gel fueron reveladas para la actividad de hexocinasa se colocaron junto a los geles que se guardaron en amortiguador de corrida, se alinearon y con una navaja para bisturí, se cortaron pedazos de gel en los que se encontraban las hexocinasas sin teñir. Estas bandas se almacenaron en tubos Microfuga de 1.5 mL a -80 °C.

El siguiente paso fue realizar geles desnaturalizantes de SDS para determinar la cantidad de proteína en la banda cortada así como su peso molecular. Para ello se hicieron geles de poliacrilamida-SDS con un grosor de 1.5 mm. Las muestras utilizadas fueron las bandas del gel nativo y para poder cargarlas en el pozo del gel se cortaron en pedazos finos con la navaja para bisturí y con una espátula pequeña se depositó cada banda en el pozo individual, finalmente se agregaron 10 µL de buffer de muestra. Los geles se corrieron a 20 mA por gel durante aproximadamente 40 minutos (hasta que el colorante llegó al gel separador) y después se corrió a 30 mA por gel hasta que llegara al final del gel y el colorante saliera de él, aproximadamente por una hora y media. El gel se tiñó con azul de Coomassie y se tomó foto del gel. Se cortaron las bandas que estaban

cerca del peso molecular esperado para la hexocinasa, 60 KDa y 120 KDa. Estas bandas se guardaron en tubos Microfuga y se etiquetaron debidamente para posteriormente almacenarlos a 4 °C y enviarlas a secuenciar al Mass Spectrometry laboratory en Galveston, Texas. Aún en proceso de recibir las secuencias.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### ***Detección y comparación de los niveles de hexocinasa en diferentes tejidos de una planta de maíz.***

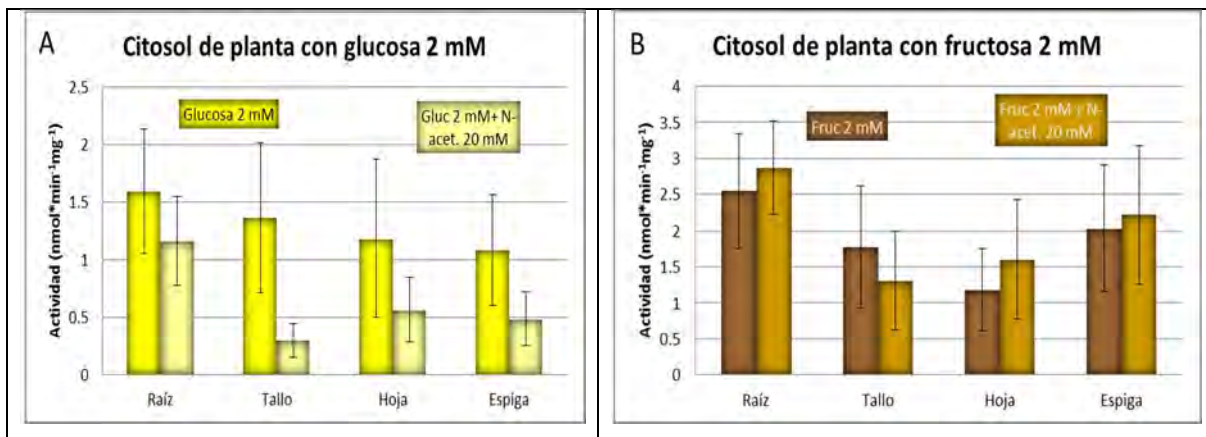
#### *Hexocinasas citosólicas*

Se ha reportado que en las plantas existen múltiples formas de hexocinasas, enzimas cuya función en la célula es variada, algunas puramente metabólicas y otras con capacidad sensora. Adicionalmente a las diferencias en su actividad hay hexocinasas con localización distinta a la citosólica, como son la mitocondrial, Golgi, plastidios, retículo endoplásmico y la nuclear, localización que se ha planteado como importante para su función [4, 6].

A pesar de los múltiples sitios en donde se ha encontrado a la enzima, el análisis de las secuencias de 10 distintas especies, solo indica que la localización en plantas sería de tres tipos: mitocondrial, plastídica o citosólica. En maíz se predice que una de las isoformas, la HXK8, es de probable localización citosólica, mientras que las otras secuencias serían de localización mitocondrial [19]. Entender la función de la hexocinasas, su patrón de expresión y su regulación puede proveer un panorama de su función fisiológica en las plantas.

Por lo anterior, uno de los objetivos de este trabajo fue determinar cuántas isoformas medidas como actividad contiene una planta madura de maíz, así que inicialmente se midió el nivel de actividad total de las hexocinasas presentes en las fracciones citosólicas y mitocondriales de diferentes tejidos de una planta madura y posteriormente detectamos las isoformas en geles nativos.

El ensayo de actividad de hexocinasa en el citosol usando como sustrato glucosa mostró que las raíces tienen mayor actividad de la enzima, seguida de las proteínas citosólicas del tallo, hoja y por último la de espiga (Figura 14A). Al comparar esta actividad de fosforilación de glucosa con la de fosforilación de fructosa encontramos que la actividad de la hexocinasa citosólica de raíz es 2 veces mayor que cuando se usa fructosa mientras que las actividades de los otros tejidos son similares con ambas hexosas (Figuras 14A y 14B). Probablemente en raíz haya una isoforma distinta que contribuye a la actividad detectada.



**Figura 16.** Actividad de HK de la fracción citosólica de diferentes tejidos de una planta de maíz. Actividad de hexocinasa usando como sustrato A) 2mM Glucosa y B) 2 mM Fructosa.

Varios carbohidratos inhibidores de la hexocinasa, tal como manoheptulosa, N-acetilglucosamina (NAG) y glucosamina han sido ampliamente utilizados como herramientas experimentales. Estudios usando manoheptulosa y glucosamina, han llevado a observar el bloqueo de los efectos señalizadores de la hexocinasa, como la represión de Glc en las células [4].

Adicionalmente, se pueden utilizar los inhibidores para conocer si existen poblaciones distintas de hexocinasas. Por lo que a la preparación citosólica se le adiciono NAG, inhibidor de tipo competitivo de las hexocinasas unidas a membranas y compuesto que además disminuye el grado de cooperatividad de la enzima en presencia de bajas concentraciones de glucosa [31]. La  $K_i$  reportada para NAG en preparaciones de raíces de maíz usando como sustrato glucosa es



de  $0.49 \pm 0.02$  mM y cuando se usa fructosa es de  $0.15 \pm 0.02$  mM [4, 11]. Aunque en otras plantas la  $K_i$  es más alta entre 0.8 a 8.0 mM. En este trabajo usamos 20 mM de NAG que es 40 veces la  $K_m$  reportada para la enzima citosólica de maíz usando glucosa como sustrato.

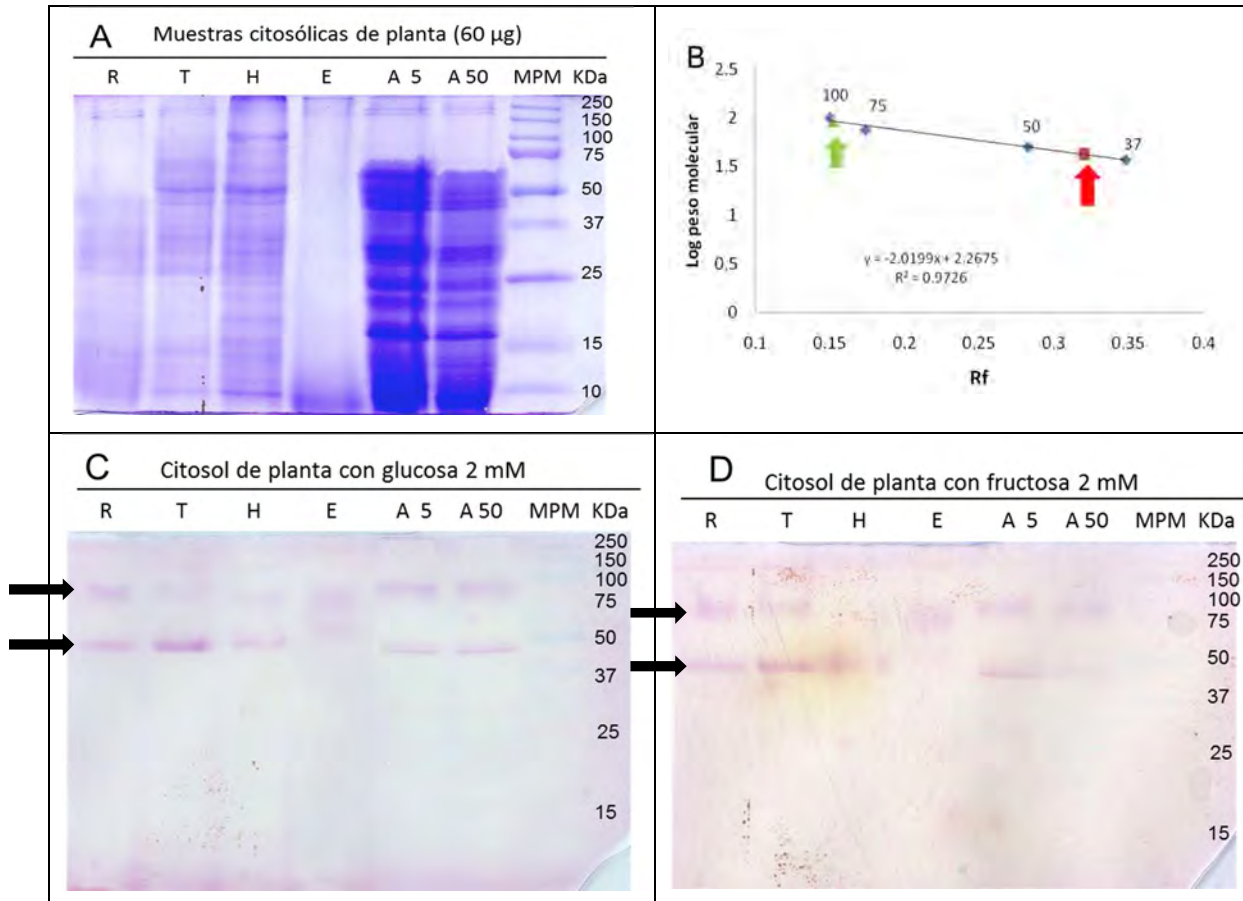
Como se observa en la Figura 14B el NAG no inhibe la actividad de fosforilación en presencia de fructosa, aun cuando la concentración de NAG fue 133 veces más alta que la  $K_i$ . Se conoce que la actividad de FK citosólica, no es inhibida ni con la manoheptulosa ni con la N-acetilglucosamina [11].

Sin embargo, si se inhibe la actividad de fosforilación cuando se utiliza glucosa como sustrato, la hexocinasa del tallo es la más inhibida, cerca del 78%, seguida de la muestra de hojas (54.2%), espigas (54.4%) y al final la de raíces (28.1%). Este resultado indica que tenemos contaminación por hexocinasas unidas a membranas y que se encuentran en cantidades distintas en cada tejido.

NAG es uno de los inhibidores para las hexocinasas no unidas a membranas aunque también se han usado la Glucosa-6-fosfato (producto de la enzima) y el análogo de éste 1,5 anhidroglucitolfosfato (1,5AnG6P), ambos capaces de inhibir a la hexocinasa mitocondrial, pero el 1,5AnG6P es el que ha utilizado con más éxito para distinguir entre la enzima citosólica de la mitocondrial en mamíferos (Wilson, 2003). Otro inhibidor muy usado es uno de los productos de la enzima el ADP ( $k_i = 20-40$   $\mu$ M) [4, 11].

Para determinar si en las fracciones citosólicas teníamos una población distinta en pesos moleculares y por tanto en función se realizó el corrimiento electroforético de las muestras, una vez separadas las proteínas, el gel se sometió a un procedimiento de re-naturalización, esto es la remoción del SDS y que la enzima recuperará su forma nativa, posteriormente se determinó la actividad añadiendo una solución similar a la que se usó para la determinación de actividad

en tubo y por comparación con el carril del estándar de peso molecular se determinó el peso molecular de las bandas que presentaron actividad (Figura 15).



**Figura 17.** Isoformas de hexocinasa de las fracciones citosólicas de diferentes tejidos de una planta. Se corrieron geles de poliacrilamida-SDS con las fracciones citosólicas de Raíz (R), Tallo (T), Espiga (E), Hoja (H) y embriones embebidos en agar adicionado con 5 mM (A5) o 50 mM de glucosa (A50), así como el marcador de peso molecular. Una vez concluida la corrida el gel de PAGE-SDS fue re-naturalizado según se detalla en materiales y métodos. **A** PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie, **B** Curva de pesos moleculares en donde se muestra la localización de las dos bandas que presentaron actividad después de re-naturalizar el gel **C**. Gel re-naturalizado en donde se detectó la actividad de fosforilación de glucosa de la muestra y **D** Detección de hexocinasas usando como sustrato fructosa. En los geles re-naturalizados la actividad se detectó usando un sistema acoplado en el que al final el NBT es reducido, por lo que la sal de formazán se deposita en la zona que corresponde a la enzima fosforilante.

Cabe mencionar que la cantidad de proteína que se corrió fue distinta debido principalmente a que hubo tejidos en donde fue difícil extraer la proteína, pese al haber usado cantidades 10 veces más tejido, como en las espigas. Se concentraron algunas de las fracciones y aún no se logró igualar la cantidad de proteína cargada (Figura 15A). A pesar de lo anterior se realizó la detección de las bandas que presentaban actividad (Figuras 15C y 15D).

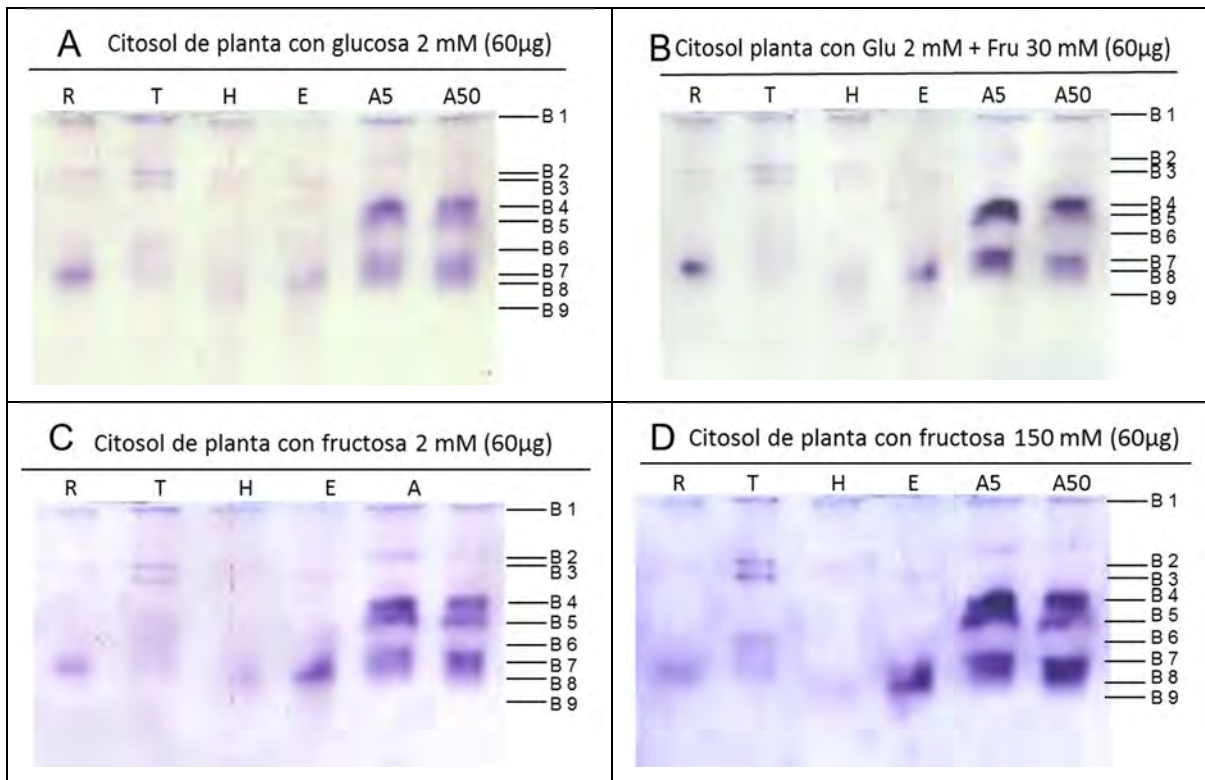
En todas las fracciones citosólicas de los diferentes tejidos se encontraron dos bandas una de aproximadamente 42 KDa y la otra de 91 KDa, excepto en espigas en donde la banda de bajo peso molecular es de 55 KDa (Figura 6B y 6C). En bacterias las hexocinasas tienen un peso molecular entre 32 a 37 KDa y son casi totalmente específicas para glucosa [32]. En levadura existen dos isoformas de hexocinasas, PI y PII, y también con actividad casi exclusiva de glucocinasas [33]. En vertebrados hay 4 isoformas, 3 con un peso molecular de 100 KDa y 1 con un peso de 50 KDa (hexocinasa tipo IV o D, o también llamada glucocinasa). Las 3 hexocinasas están codificadas por genes que al parecer tuvieron un ancestro con un peso de 50 KDa y que probablemente se duplico y fusiono en el genoma. Interesantemente a pesar de presentar dos sitios de unión al sustrato las formas I y II de las hexocinasas de mamífero solo presentan actividad catalítica en la mitad hacia el carboxilo terminal y la segunda es una porción denominada regulatoria y alostérica [24, 25]. Arabidopsis también tiene una isoforma con un peso molecular alrededor de 97 KDa [32]. Por lo que los resultados encontrados coinciden con los pesos moleculares esperados para la hexocinasas.

Cuando se ensayó la actividad en presencia de fructosa se detectó que en todos los tejidos excepto en espigas se encuentran las dos bandas de peso molecular. Lo anterior muestra que las hexocinasas de maíz también pueden usar a la fructosa como sustrato, excepto la forma de 55 KDa de espiga que no aparece en el gel en presencia de fructosa (Figura 15D), sin embargo debido a que no se

cargó mayor cantidad de proteína no podemos afirmar que no exista una banda a ese peso molecular.

Para conocer cuántas isoformas de hexocinasa contenían cada una de las fracciones citosólicas de los diferentes tejidos se realizó el corrimiento de la proteína citosólica en geles nativos y se reveló su actividad en el gel (Figura 16). En total se encontraron 9 bandas en las muestras citosólicas que fueron nombradas de mayor a menor corrimiento electroforético B1 a B9. No todas las fracciones citosólicas presentaron las 9 bandas o isoformas de las hexocinasas, ni tampoco con la misma intensidad.

En raíz se encuentran 3 bandas, bandas 1, 2, y 8, siendo B8 la más intensa, probablemente la banda 8 sea la responsable de la alta actividad encontrada en ese tejido e insensible a NAG, sería una banda citosólica. En tallo aparecen las bandas B1, B2, B3 y muy tenues B6, B7 y B8. La actividad en tallo fue aproximadamente 80% inhibida por NAG por lo que es probable que las bandas que no son la B8 podrían ser mitocondriales y o bien alguna otra citosólica. En hoja aparecen 4 bandas muy tenues B1, B2, B3 y B9. En espiga se distinguen 2, B3 y B9 muy intensa, y si recordamos que la actividad total de espiga era inhibida aprox. 50% con NAG por lo que la B3 probablemente sea mitocondrial y la B8 citosólica. Mientras que en los embriones de maíz germinados 24 h se observaron bandas muy intensas de actividad que no aparecen en los otros tejidos de la planta como son las bandas 4, 5 y 7, aunque también presentaban la banda 8 y una muy pobre actividad de las bandas 1 y 2.



**Figura 18.** Detección de isoformas de hexocinasas de las fracciones citosólicas de diferentes tejidos de una planta madura en geles nativos, así como muestras citosólicas de embriones embebidos en agar con 5 mM o 50 mM de glucosa. En todos los casos se corrieron 60 µg de proteína. **A** ensayo con glucosa 2 mM como sustrato. **B** ensayo con glucosa 2 mM más 30 mM de fructosa como sustrato. **C** gel con muestras citosólicas de planta con fructosa 2 mM como sustrato. **D** gel con el ensayo de fructosa 150 mM como sustrato.

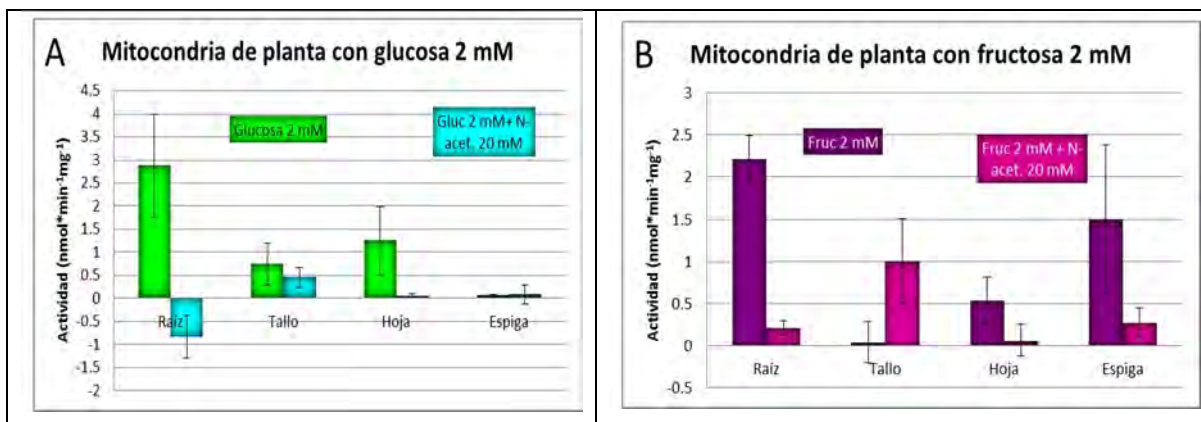
### *Hexocinasas mitocondriales*

La caracterización inicial tanto de los genes de *Arabidopsis* como de arroz mostró que las hexocinasas se encuentran dentro de una familia compuesta de 6 y 10 miembros respectivamente [17, 20, 21, 34]. Si bien tienen localización variada y características de actividad distinta. Hay dos isoformas en *Arabidopsis* y en arroz que no solo presentan la actividad de hexocinasa, sino que también son reconocidas como sensores de glucosa o transductores, son entonces AtHXK1, AtHXK2, OsHXK5, y OsHXK6, importantes reguladores de la expresión de genes en planta dependientes de la concentración de azúcares que perciben [19, 20, 21].

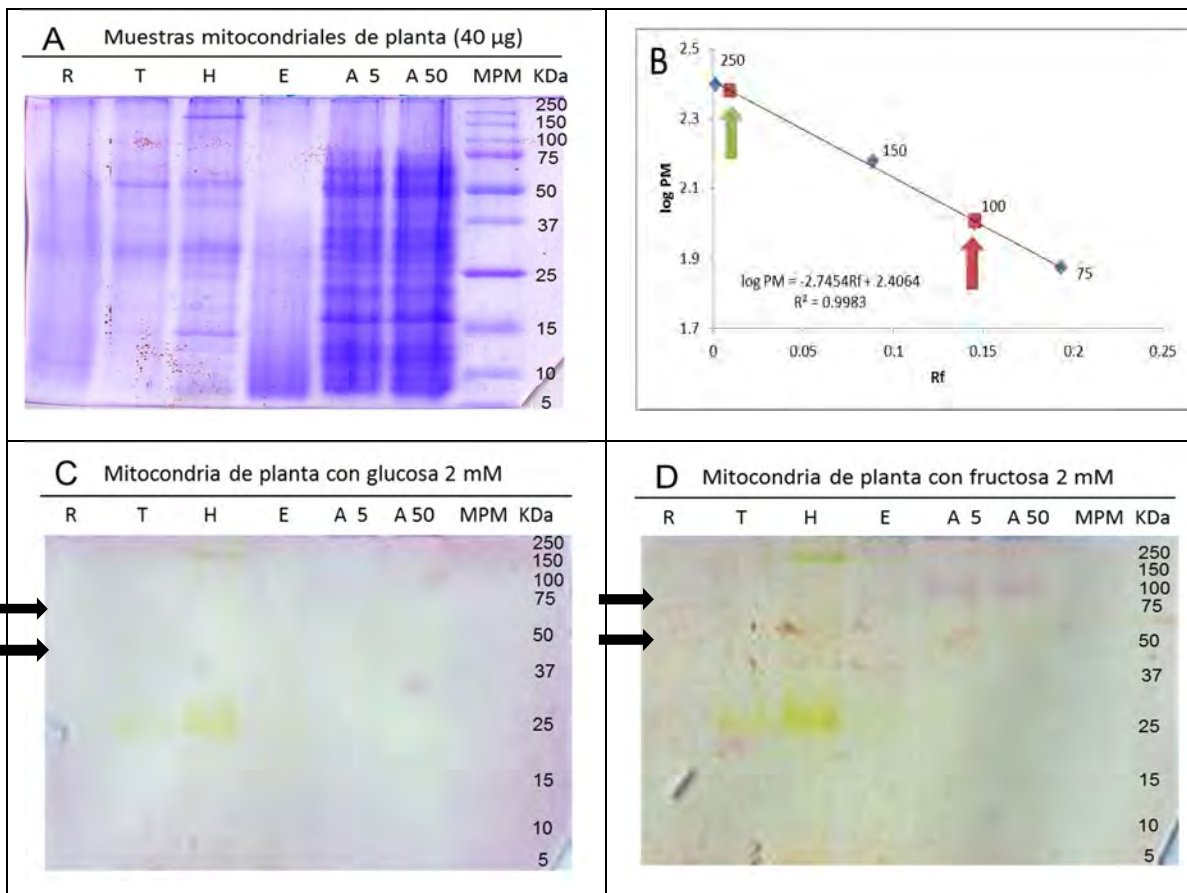
Con la reciente obtención del genoma completo del maíz, se encontró que hay al menos 10 posibles genes que codifican para hexocinasas [19] y en nuestras fracciones citosólicas de la planta madura nos muestran al menos 9 distintas hexocinasas, no todas muy claras y abundantes. Si bien hemos mencionado que algunas de ellas podrían proceder de contaminación con hexocinasas mitocondriales, debido a que la actividad total fue susceptible al NAG y que al menos la banda 3 parece ser una isoforma mitocondrial. Mientras que la banda 8 es altamente probable que sea de procedencia citosólica. Por lo anterior buscamos otras isoformas en el organelo que se menciona con el mayor número de isoformas de hexocinasas en plantas, la mitocondria.

Encontramos que en todos los tejidos utilizados hay actividad de la hexocinasa mitocondrial usando como sustrato glucosa, excepto en las espigas (Figura 17A). Las raíces presentan la mayor actividad de hexocinasa, seguido de la hoja y luego el tallo. Todos los tejidos excepto el tallo (40% inhibición) presentan un 100% de inhibición con NAG.

Al medir la actividad de hexocinasa en presencia de fructosa encontramos que todos los tejidos estudiados presentaban actividad y todos eran inhibibles por NAG, excepto los tallos.



**Figura 19.** Actividad de HK de la fracción mitocondrial de diferentes tejidos de una planta de maíz. Actividad de hexocinasa usando como sustrato A) 2mM Glucosa y B) 2 mM Fructosa.



**Figura 20.** Isoformas de hexocinasa de las fracciones mitocondriales de diferentes tejidos de una planta. Se corrieron geles de poliacrilamida-SDS con las fracciones mitocondriales de Raíz (R), Tallo (T), Espiga (E), Hoja (H) y embriones embebidos en agar adicionado con 5 mM (A5) o 50 mM de glucosa (A50), así como el marcador de peso molecular. Una vez concluida la corrida el gel de PAGE-SDS fue re-naturalizado según se detalla en materiales y métodos. **A** PAGE-SDS teñido con azul de coomassie, **B** Curva de pesos moleculares en donde se muestra la localización de las dos bandas que presentaron actividad después de re-naturalizar el gel. **C** Gel renaturalizado en

donde se detectó la actividad de fosforilación de glucosa de la muestra y **D** Detección de hexocinasas usando como sustrato fructosa. En los geles renaturalizados la actividad se detectó usando un sistema acoplado en el que al final el NBT es reducido, por lo que la sal de formazan se deposita en la zona que corresponde a la enzima fosforilante.

Para determinar el peso molecular de las hexocinasas de las fracciones mitocondriales de los diferentes tejidos de una planta de maíz, se realizaron geles de poliacrilamida-SDS, se separaron las proteínas en el gel y luego se renaturalizó, según se describió en materiales y métodos. Se observó que las bandas que se revelaron por actividad se quedaron muy cercanas al borde del gel concentrador, para todos los tejidos de la planta excepto para los embriones en donde se observa además de esa banda, una de peso mayor a 250 KDa, una banda de aproximadamente 120 KDa. Lo anterior indica que la hexocinasa se está oligomerizando, a pesar de que el corrimiento electroforético se realizó en presencia de SDS, lo que tendería a disgregar al complejo.

En mamíferos se ha encontrado que la hexocinasa forma un oligomero consigo misma y con otras proteínas. Consigo misma puede formar dímeros o tetrámeros, pero también se une a proteínas en la mitocondria al menos se conoce que se une a VDAC una proteína de 32 KDa de peso molecular y a su vez está a ANT proteína que en músculo de rata tiene un peso molecular aproximadamente de 37 KDa [35].

Para conocer el número de isoformas en las fracciones mitocondriales se realizaron los geles nativos en el que se separaron las fracciones mitocondriales de los diferentes tejidos, cabe mencionar que en un principio el experimento se realizó de manera idéntica a las fracciones citosólicas, sin embargo no se detectó ninguna banda.

Dos hexocinasas mitocondriales han sido purificadas en las raíces de maíz, una de ellas a homogeneidad [30]. Sin embargo, se plantea en ese estudio que



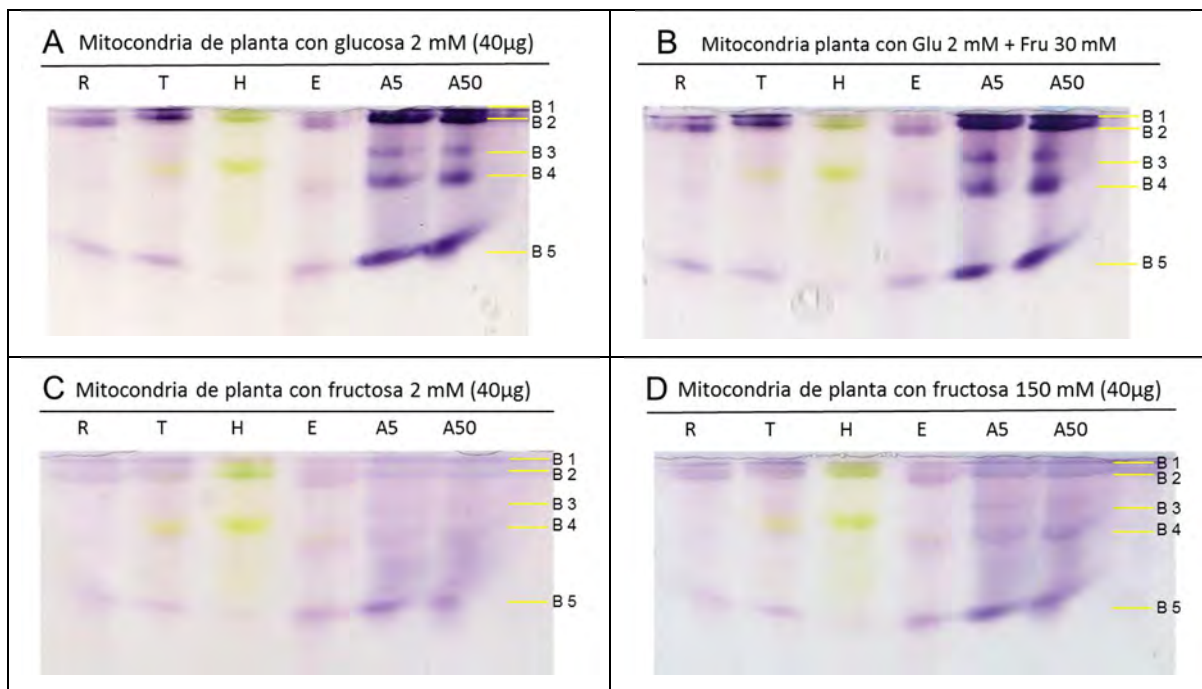
contrario a la hexocinasa mitocondrial de rata la de maíz no se disocia de la mitocondria usando altas concentraciones de G6P, clotrimazol (azole antifúngico) o tiopental (anestésico que permeabiliza a las membranas), reactivos que se conoce disgregan a la enzima del complejo VDAC-ANT, con el que se unen a la membrana mitocondrial [30]. Los autores proponen que la enzima en maíz es más hidrofóbica por lo que el tratamiento con éstos reactivos no es exitoso.

Debido a la hidrofobicidad aumentada del amino terminal de la enzima, usamos n-dodecilmaltósido, detergente suave que se usa de manera habitual para observar complejos de proteína en los geles azules nativos [36]. Con el uso del detergente si logramos observar las bandas de actividad, y encontramos que la actividad es aún mayor a la detectada en las fracciones citosólicas, por lo que estos geles fueron cargados con 40  $\mu\text{g}$  de proteína en lugar de 60  $\mu\text{g}$ .

Fueron 5 las bandas detectadas por actividad en presencia de glucosa. Nuevamente no todas las bandas están presentes en todos los tejidos y los embriones son las que contienen todas (Figura 19). Las raíces contienen a las bandas 1 y 4, los tallos y espigas también contienen 1 y 4 pero también la banda 3 y las hojas las bandas 1, 3 y 4. Debido a que no aparece la banda 6 en las fracciones mitocondriales, es altamente probable que está isoforma sea exclusivamente citosólica. La banda 2 también parece ser una isoforma citosólica ya que no se encuentra en las fracciones mitocondriales de raíces, hoja y espiga, y si se encuentra en sus fracciones citosólicas (Figura 16), si bien la banda 2 también se encuentra en las fracciones mitocondriales de embriones, aunque más tenues que las otras (Figura 19) lo que sugiere que la banda 2 puede ser un contaminante en nuestra preparación mitocondrial.

Cuando el ensayo de fosforilación se realiza usando exclusivamente fructosa, aparece una banda ancha adicional entre la banda 3 y 4 y desaparecen las bandas cercanas al gel concentrador. Una de las explicaciones para lo anterior es la capacidad de la fructosa de inhibir la asociación o disgregar la forma

oligomérica de la enzima, papel que ha sido documentado en el caso de la isoenzima en rata [10].



**Figura 21.** Patrón de isoformas de la hexocinasa mitocondrial de diferentes tejidos de una planta madura de maíz. Se observan hasta 5 isoenzimas en las diferentes partes de la planta madura de maíz, sin embargo no todas las formas de la enzima se encuentran en cada tejido. Los ensayos de actividad en geles nativos se realizaron con 40 µg de proteína. **A** ensayo con glucosa 2 mM como sustrato. En **B** se utilizó una combinación de glucosa 2 mM más fructosa 30 mM como sustratos. **C** y **D** son los geles correspondientes a los ensayos con fructosa 2 mM y fructosa 150 mM, respectivamente.

### ***Detección y comparación de los niveles de hexocinasa en embriones de maíz embebidos en presencia o ausencia de carbohidratos***

#### ***Hexocinasas citosólicas***

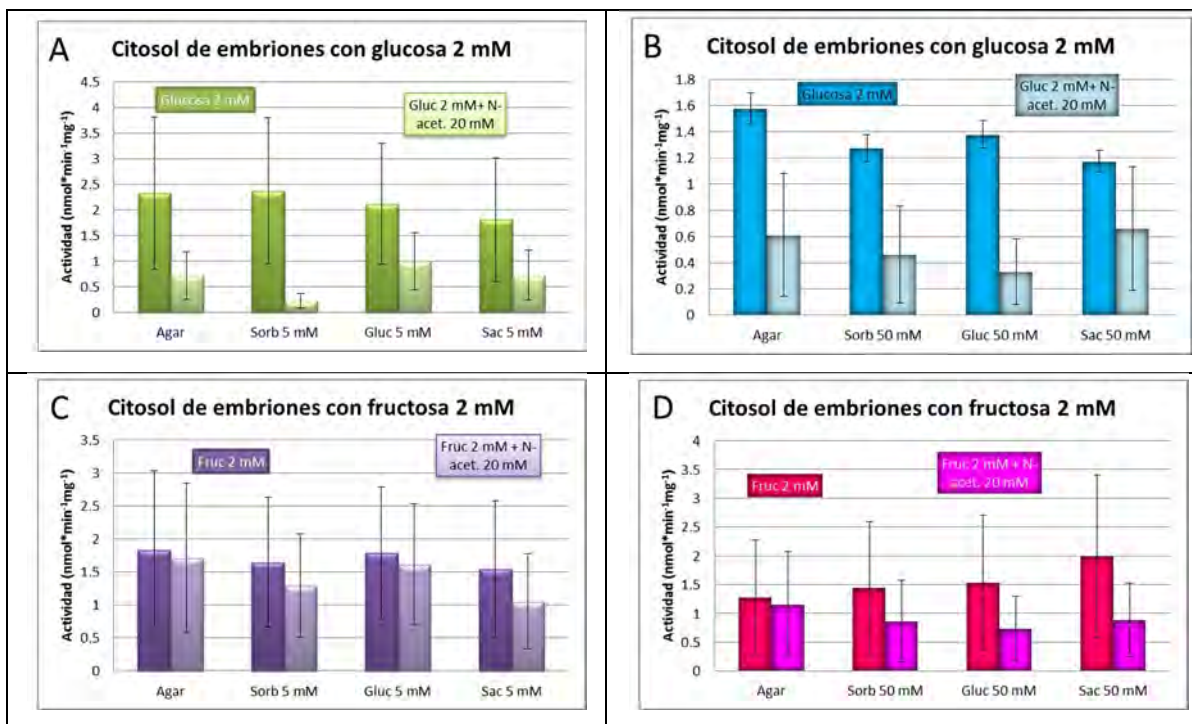
Se ha mencionado que las hexocinasas pueden presentar una función sensora más que metabólica. Estudios en Arabidopsis han demostrado que la hexocinasa tipo 1 es una enzima que no necesita de llevar a cabo la fosforilación

de las hexosas para comunicarle a la célula que debe de cambiar su metabolismo [20]. Se sugiere que la enzima al entrar en contacto con las hexosas presenta un movimiento conformacional que es percibido como una señal de abundancia de carbohidratos, con lo cual controla el crecimiento celular y la expresión de genes [6, 32]. Así se conoce que la abundancia de carbohidratos lleva a la reducción de la expresión de enzimas importantes en la fijación de  $\text{CO}_2$  y aumenta la síntesis de almidón [6].

En la búsqueda de las enzimas que pudieran ser reguladas por carbohidratos se buscó si las hexocinasas también eran sujetas a esta regulación. Por lo que se midió la actividad de la enzima en las fracciones citosólicas y mitocondriales de embriones de maíz germinados por 24 h.

Encontramos que las actividades de las fracciones citosólicas de embriones embebidos en agar, sorbitol, glucosa y sacarosa usando glucosa y fructosa como sustrato eran similares (Figura 20), independientemente de si se incubaba el tejido con los carbohidratos a 5 mM (Figura 20 A y C) o a 50 mM (Figura 20 B y D), actividad distinta a la encontrada en el trabajo de Castañeda-Rico (2008). Lo que puede explicarse debido a que en el trabajo de Castañeda-Rico la obtención de la enzima se realizaba solamente con la centrifugación de la muestra, quitando la fracción mitocondrial, pero quedaban aún todas las otras fracciones microsomales, en donde están las vesículas de otros organelos como golgi, retículo endoplásmico e incluso contaminación mitocondrial que no exploramos en aquella ocasión, por lo que los cambios observados en el patrón de actividad de los embriones pudo deberse a que existían residuos de otras isoenzimas de compartimentos membranosos y no solamente citosólicos.

La actividad fosforilante de glucosa es más susceptible a la inhibición por NAG que la de fosforilación de fructosa. La inhibición de la actividad de hexocinasa con NAG fue de 50 al 62% al medir la actividad con glucosa.

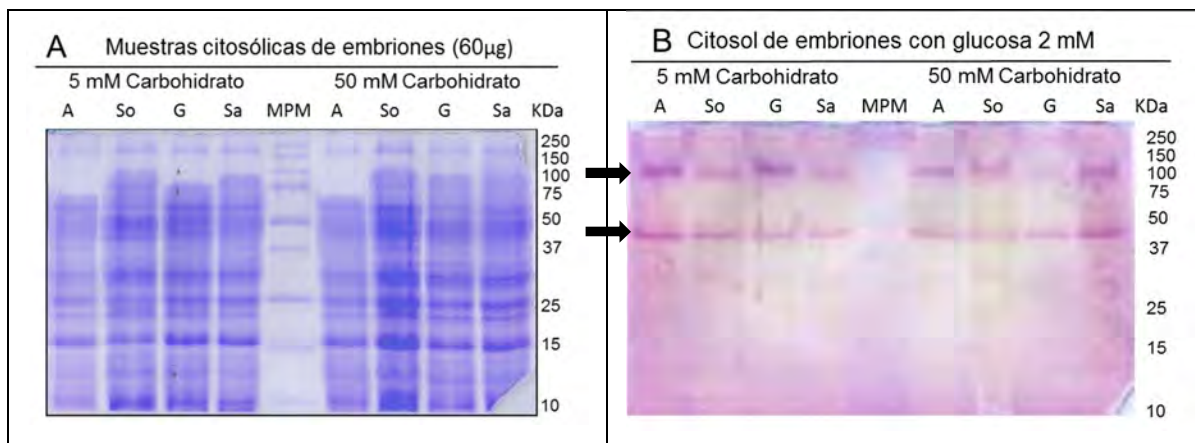


**Figura 22.** Actividad de hexocinasas de las fracciones citosólicas de embriones embebidos en diferentes carbohidratos. Se obtuvieron las fracciones citosólicas de embriones embebidos con agar (control), Sorbitol, Glucosa y Sacarosa en concentraciones 5 mM y 50 mM. **A** ensayo de actividad de la fracción citosólica de embriones embebidos en carbohidrato a concentración 5 mM con glucosa 2 mM como sustrato. **B** son los ensayos de las muestras sembradas en carbohidratos 50 mM con glucosa 2 mM como sustrato. En **C** y **D** se muestran las actividades de las muestras de embriones embebidas en carbohidrato 5 mM y 50 mM, respectivamente, y las cuales emplean como sustrato fructosa 2 mM.

También se determinó el peso molecular de las hexocinasas de las fracciones citosólicas para detectar si alguna había cambiado por efecto del tratamiento con los carbohidratos y como se observa en la Figura 21 B, no hubo cambio en el peso molecular, se encontraron dos bandas de peso molecular aproximado de 100 KDa y otra de alrededor de 42 KDa. Nuevamente bandas del peso molecular esperado y consistente con las que obtuvimos en los otros tejidos de la planta de maíz.

La intensidad de la banda varía ligeramente con el tratamiento, es menor en la fracción citosólica de agar, y mayor en la muestra de glucosa 5 mM en relación a sorbitol y sacarosa 5 mM, aunque a 50 mM todas las bandas con carbohidratos

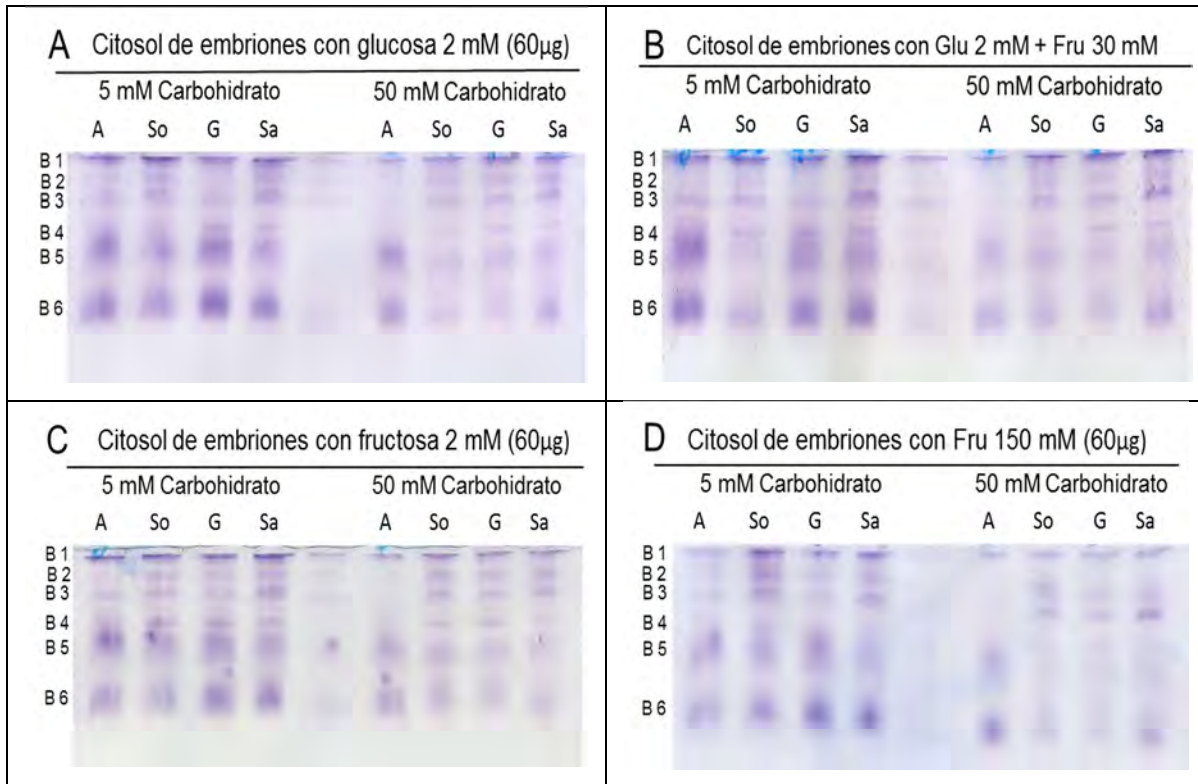
se incrementaron. Lo que habla de una expresión diferencial de actividad pese a que al medir la actividad *in vitro* no hubo un cambio significativo en la actividad en las diferentes fracciones citosólicas.



**Figura 23.** Determinación del peso molecular de las hexocinasas citosólicas de embriones. Se realizó el corrimiento electroforético de cantidades similares de proteína y el gel. **A** se tiñó con azul de Coomassie y **B** otro gel cargado de manera similar se re-naturalizó y determinó la actividad de hexocinasa en el gel, usando glucosa como sustrato.

Para determinar el número de isoformas presentes en la fracción citosólica de embriones tratados con carbohidratos se corrieron geles nativos y se determinó la actividad de hexocinasa en presencia de glucosa y fructosa (Figura 22). Se detectaron 6 bandas de hexocinasas en las fracciones citosólicas. Las bandas 1, 2, 3 y 4 fueron las más tenues y de intensidad semejante a la mayoría de las condiciones probadas. Pero las bandas 5 y 6 si fueron distintas en intensidad.

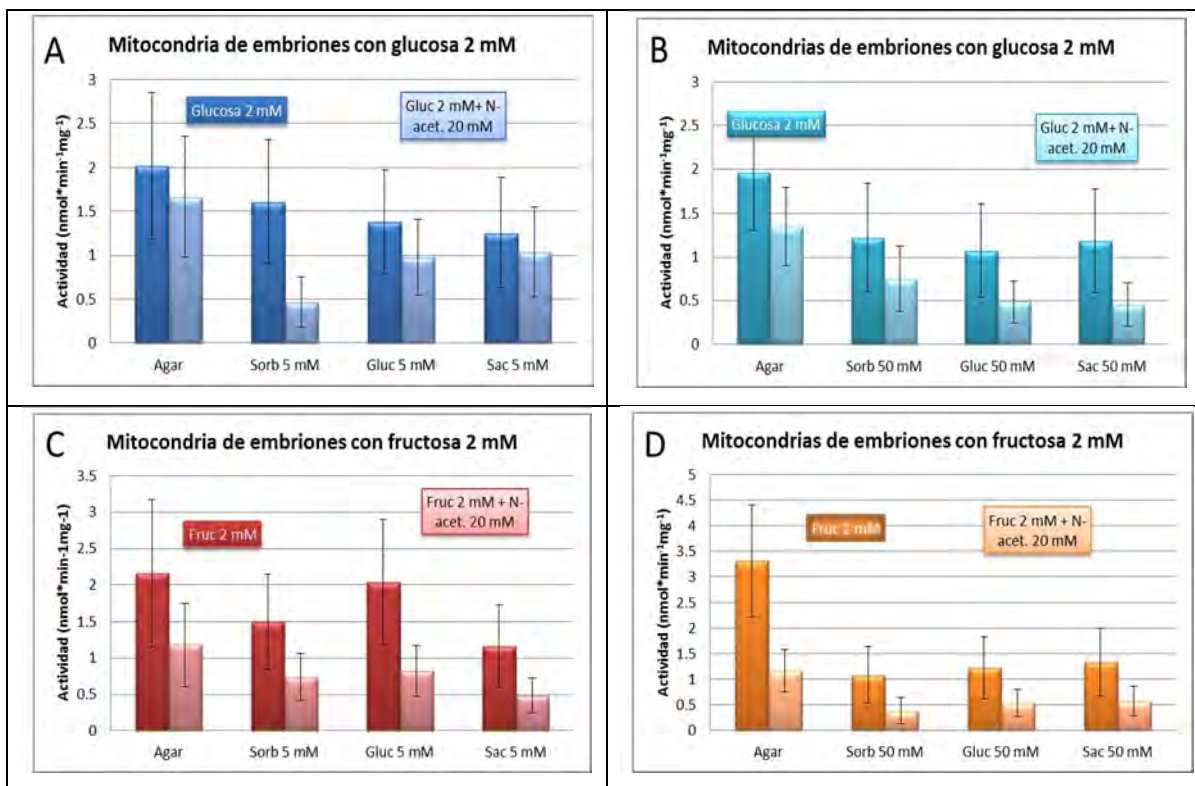
La banda 5 se mantuvo constante pero baja a concentración 50 mM de los carbohidratos al igual que la banda 6. Mientras que a 5 mM de los carbohidratos ambas bandas la 5 y la 6 tuvieron intensidades semejantes. Lo anterior indica que las actividades de todas las isoformas citosólicas detectadas en el gel son similares en intensidad y número independiente de la hexosa que fosforilen.



**Figura 24.** Patrón de isoformas de la hexocinasa citosólica de embriones embebidos en diferentes concentraciones y tipo de carbohidratos. Se detectó el patrón de enzimas que fosforilan glucosa, fructosa o ambas hexosas. A Agar, So Sorbitol, G Glucosa y Sa Sacarosa.

### *Hexocinasas mitocondriales*

En cuanto a la actividad de las hexocinasas mitocondriales se observa que hay una tendencia a disminuir cuando los embriones son tratados con los carbohidratos, ya sea a 5 o 50 mM de éstos, aunque la diferencia no es significativa cuando se mide la actividad en presencia de glucosa. La actividad fosforilante en presencia de fructosa si es menor (3 veces menos) en las fracciones mitocondriales de embriones tratadas con 50 mM de sorbitol, fructosa y sacarosa.

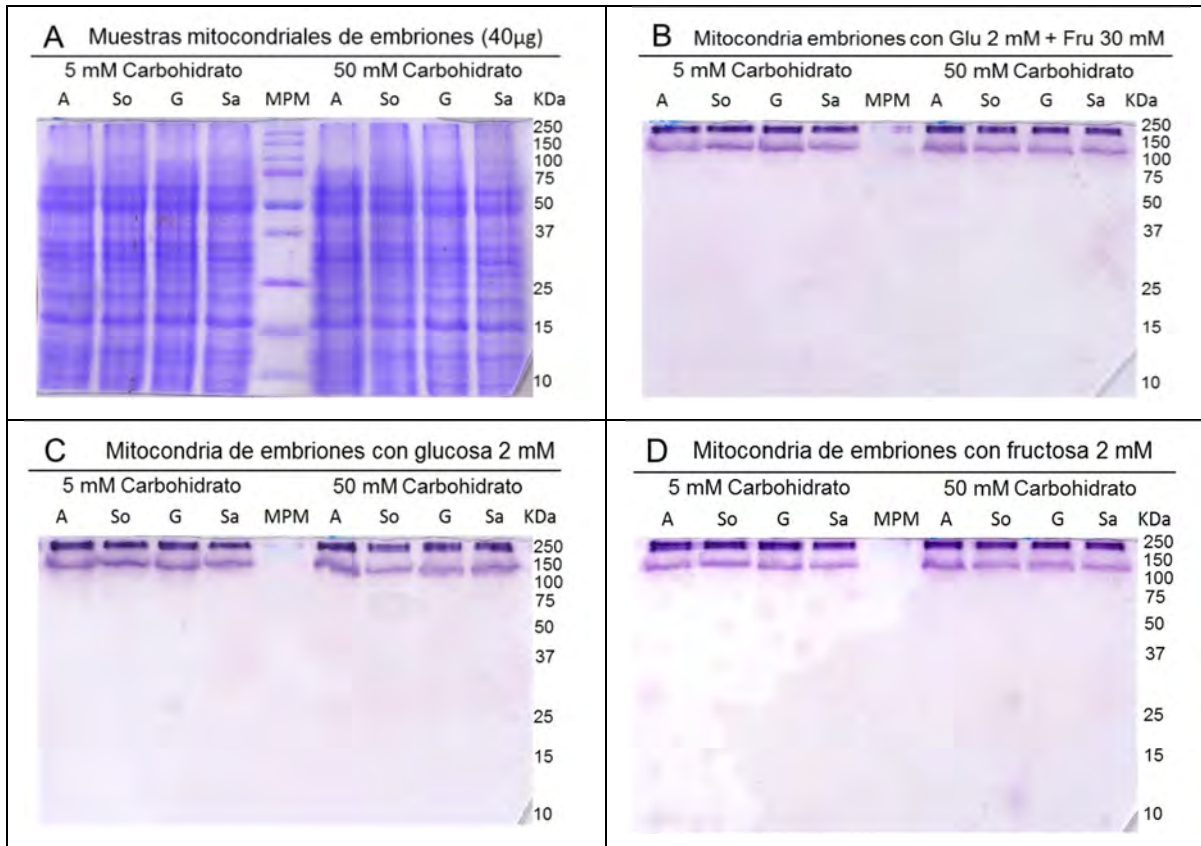


**Figura 25.** Actividad de hexocinasas de las fracciones mitocondriales de embriones embebidos en diferentes carbohidratos. Se obtuvieron las fracciones mitocondriales de embriones embebidos con agar (control), Sorbitol, Glucosa y Sacarosa en concentraciones 5 y 50 mM.

Para determinar si había diferencias en el peso molecular de las enzimas mitocondriales de embriones con los tratamientos se realizó un gel de poliacrilamida-SDS y luego se re-naturalizó para detectar a la enzima por actividad.

El peso molecular determinado para las hexocinasas mitocondriales de los embriones se mantuvo constante independientemente del tipo de carbohidrato con el que se trataron a los embriones. Pero lo que es sorprendente, es que no hay bandas de peso molecular bajos, hay dos bandas de pesos moleculares por arriba de 100 KDa, lo que indica que la enzima se encuentra en forma agregada. Un peso molecular aproximado de 250 y otra de 120 KDa. Los pesos moleculares mínimos encontrados en este estudio fueron de 42 a 55 KDa, por lo que si tomamos estos pesos como el del monómero tendríamos un complejo de 6 a 5

hexocinasas o de 3 a 2 hexocinasas unidas. O bien intercaladas a alguna de las proteínas con las que se unen, la VDAC o el complejo VDAC-ANT.



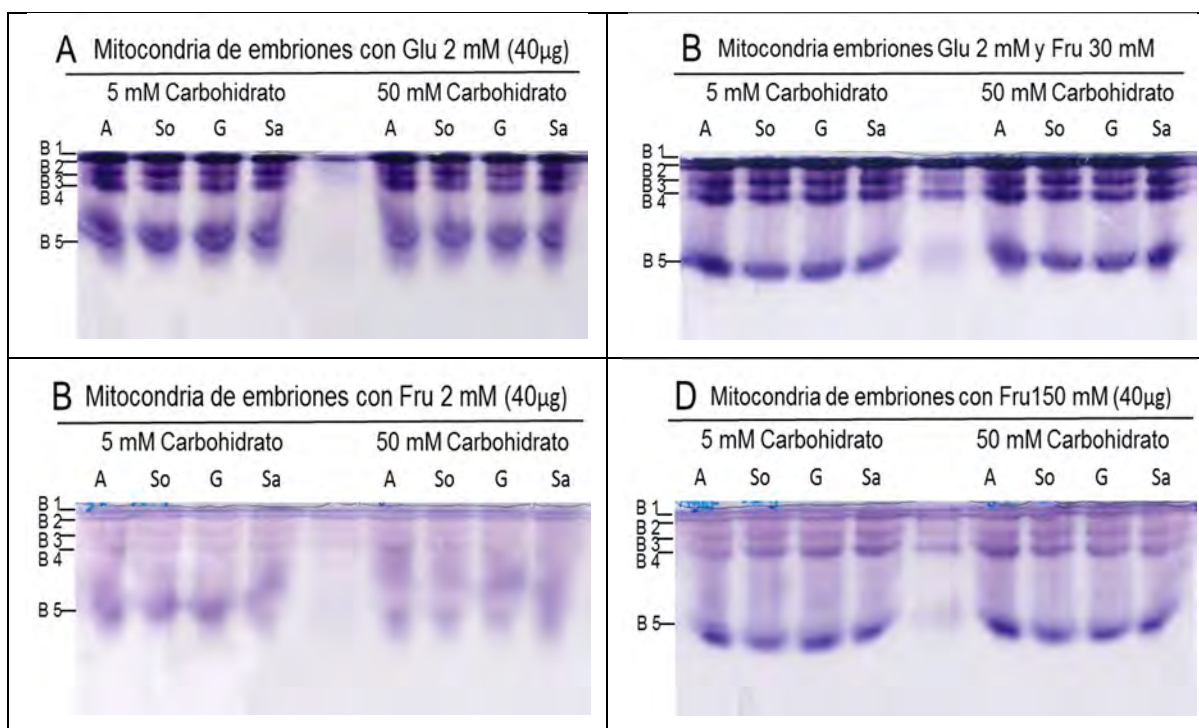
**Figura 26.** Determinación del peso molecular de las hexocinasas mitocondriales de embriones. Se realizó el corrimiento electroforético de cantidades similares de proteína y el gel **A** se tiñó con azul de Coomassie y **B**, **C** y **D** otros gels cargados de manera similar se renaturalizaron y se determinó la actividad de hexocinasa en el gel, usando glucosa, Fructosa o la combinación de ambos como sustratos.

La formación de oligómeros de la enzima mitocondrial consigo misma es la primera vez que se observa en plantas. En rata el número de hexocinasas en el complejo mitocondrial es de 4 (Wilson, 2003).

Los tetrámeros de HXK se unen por la porción que ve el citoplasma a la porina VDAC, la cual es una proteína hidropática que se encuentra embebida en la membrana externa de la mitocondria, por el lado del espacio intermembrana la VDAC une a diferentes proteínas, cuando la hexocinasas se encuentra unida a la



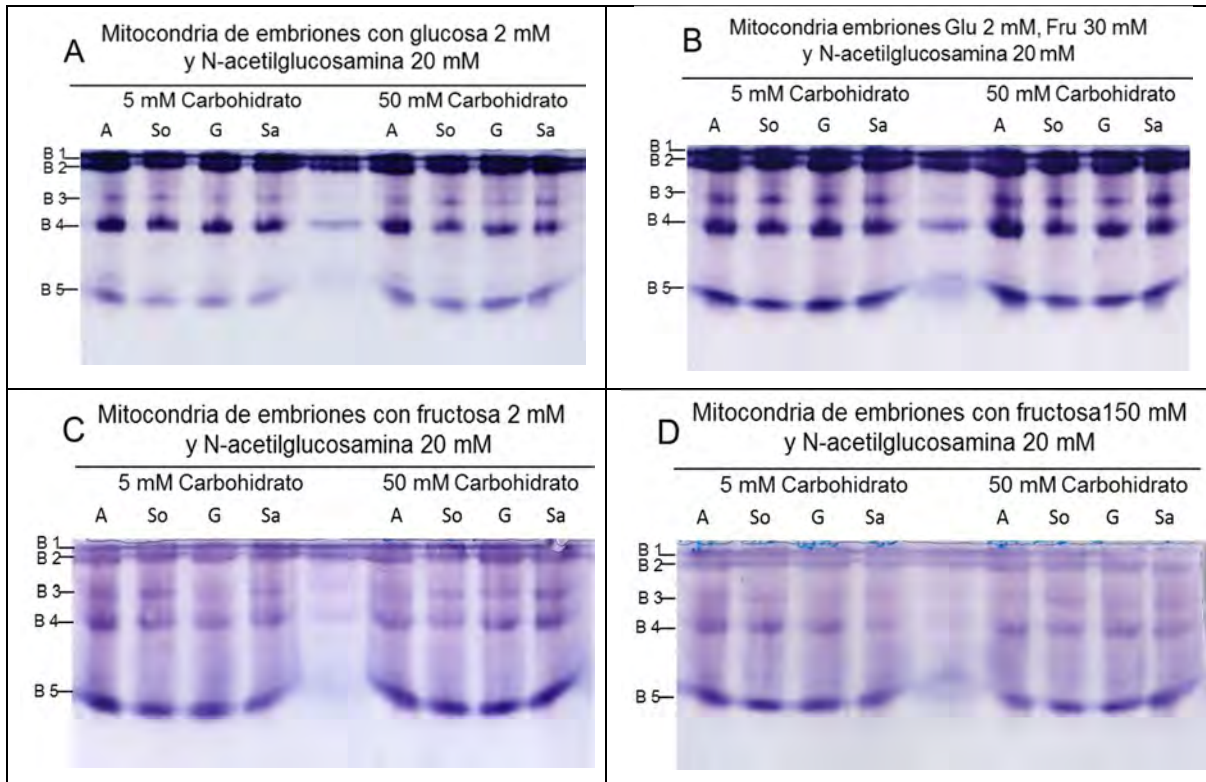
VDAC, ésta última interacciona con el translocador de adenín nucleótidos, lo que favorece el paso directo desde la matriz mitocondrial del ATP recién sintetizado hasta la hexocinasa para que lleve a cabo la síntesis de G6P y le devuelva a la matriz el ADP producido [37].



**Figura 27.** Patrón de isoformas de la hexocinasa mitocondrial de embriones embebidos en diferentes concentraciones y tipo de carbohidratos. Se detectó el patrón de enzimas que fosforilan glucosa, fructosa o ambas hexosas. A Agar, So Sorbitol, G Glucosa y Sa Sacarosa.

Buscando el número de isoformas que se encuentran en la fracción mitocondrial de embriones tratados con carbohidratos, encontramos que existen 5 bandas que se revelan con actividad, tanto fosforilando glucosa como fructosa (Figura 25). Sin embargo hay una diferencia importante en la intensidad de las bandas cuando se usa glucosa o la mezcla glucosa con fructosa la actividad de todas las bandas es alta. Pero cuando se coloca fructosa a 2 mM o 150 mM las bandas 1 y 2 presentan poca actividad. En presencia de 2 mM de fructosa la banda que se observa más intensa es la 4 y aparece una banda difusa y ancha entre las bandas 3 y 4. En presencia de fructosa 150 mM se ven claras las bandas, siendo la B4 la más activa, seguida de la banda 3.

El efecto de fructosa en la actividad de las isoformas de hexocinasa mitocondrial, puede deberse a que la enzima sea poco afín a la fructosa. Lo anterior nos hace sospechar que las bandas 1 y 2 corresponden a formas oligoméricas de las bandas de corrimiento menor.



**Figura 28.** Ensayo de actividad hexocinasa en presencia de inhibidor (NAG) utilizando como sustratos glucosa 2 mM (A), glucosa 2 mM más fructosa 30 mM (B), y fructosa 2 mM y 150 mM (C y D). Se detectó la inhibición de las bandas 3 y 5 en el ensayo con glucosa, mientras que en el ensayo con fructosa, las bandas inhibidas fueron las 3, 4 y en menor medida la banda 2.

Cuando se añade glucosamina la actividad en el gel de las bandas reveladas usando glucosa como sustrato muestra que la banda 5 disminuye y también la banda 3. La banda 3 se observa que es muy tenue en el extracto de glucosa 5 mM, siendo que en el gel sin el inhibidor la banda era igualmente intensa que en los otros tratamientos. El uso de 30 mM fructosa como sustrato protege de la inhibición de la NAG, ya que la banda 3 se reduce menos que con glucosa. Contrario a la adición de 2 mM fructosa, ya que si se observa que disminuyen todas las bandas, y se observa un incremento de la banda 5.

La fructosa puede ser una herramienta interesante para estudiar la capacidad de la hexocinasa de formar el oligomero y mantener o regular su actividad ya que como se observan en los geles la actividad es baja en presencia de fructosa, además de que se ha mencionado en la literatura que tanto las hexocinasas forforilantes de glucosa como la fructosa pueden estar regulándose cruzadamente [16, 28].

Por lo que en este estudio encontramos que existen varias isoformas mitocondriales y con mayor actividad que la que presentan las formas citosólicas y que probablemente algunas de las que se encuentran en la fracción citosólica son también las mismas formas mitocondriales que contaminan en poca medida la fracción. Por lo que aún se necesita un estudio más profundo para conocer su localización, como es el aislamiento de cada una de las fracciones con métodos que aumenten la pureza de la preparación y la medición de enzimas propias de cada preparación para determinar el grado de pureza o contaminación.

La obtención de las secuencias de las isoformas nos dará luz sobre cuál es la isoenzima que se está determinando y nos abrirá la puerta para clonar y expresar cada isoenzima por separado y determinar su papel en la planta de maíz.

## **CONCLUSIONES**

1. Se encontró que los pesos moleculares de las hexocinasas de citosol de maíz son de 42 y 100 en los diferentes tejidos de la planta, excepto para espigas que fue de 55 KDa.
2. Mientras que los pesos moleculares de las hexocinasas de mitocondrias fueron de alrededor de 115 KDa en los diferentes tejidos de la planta, excepto para los embriones que también presentaron una banda de peso molecular aproximado de 250 KDa. Esto sugiere que la enzima se encuentra formando un oligómero, el cual no fue sensible a la concentración de SDS y dodecilmaltosido usado en los geles de poliacrilamida.
3. Se encontraron que existen 9 bandas que fosforilan hexosas en el citosol y 5 en las fracciones mitocondriales, sin embargo, varias de las bandas que se observan en los geles nativos del citosol podrían provenir de contaminación mitocondrial.
4. Los embriones de maíz son los que contienen el mayor número de isoenzimas que fosforilan hexosas tanto en el citosol como en la mitocondrial. En citosol fueron 6 bandas las que se aprecian, mientras que en mitocondria son 5 isoformas.
5. No obstante, lo anterior no hay una diferencia significativa en el número de bandas que se obtienen si los embriones fueron o no embebidos con carbohidratos. Aunque si hubo una reducción de la intensidad o actividad de las hexocinasas cuando el tejido fue embebido en concentración alta de carbohidratos (50 mM). Probablemente el tejido en esta condición este siendo sujeto de estrés.

## **PERSPECTIVAS**

1. *Determinar que isoforma es citosólica y cual mitocondrial:*
  - a) *Una manera mediante la comparación de las secuencias de proteína con lo que hay en el genbank.*
  - b) *Otra manera sería mediante la obtención de una fracción purificada de mitocondrias.*
2. Evaluar el efecto de concentraciones distintas de fructosa sobre la obtención de bandas de alto peso molecular en las enzimas mitocondriales.
3. Determinar si en realidad se encuentran los oligómeros:
  - a) mediante la precipitación de la enzima con anticuerpos, anti-hexocinasa, anti-VDAC, anti-ANT.
  - b) A través de la realización de geles en gradiente azul nativos, geles utilizados para determinar formas oligoméricas de proteínas mitocondriales.
  - c) Realizar el entrecruzamiento de la hexocinasa con conocidos entrecruzadores.
4. Caracterizar mejor a la enzima utilizando geles de isoelectroenfoque.
5. Determinar si hay otros factores como las hormonas que modifican la actividad de las diferentes isoenzimas de hexocinasa, ya que los embriones producen estas hormonas durante la germinación y se conoce que modifican varias enzimas del metabolismo de carbohidratos como a las alfa-amilasas, la sacarosa sintasa y la UDPglucosa pirofosforilasa, probablemente la hexocinasa podría ser regulada en estas condiciones.

## ANEXOS

### ANEXO I. Programación De Lecturas En El Multiscan

1. Encender el lector de microplacas tipo ELISA Marca LabsystemsMultiskan® MCC/340
2. El aparato realiza su calibración
3. El filtro de lectura inicial es de 340 nm,
4. si se requiere **modificar la longitud de onda** hay que Apretar el botón “means parameter”
  - a) En la pantalla aparece Filter 340 nm
  - b) Apretar means mode
  - c) Apretar el filtro que se requiera, el equipo cuenta con 8 filtros. Por ejemplo al apretar 3 el filtro que se moverá es el que corresponde a la longitud de onda de 414.

Filtro	Longitud de onda (nm)
1	340
2	405
3	414
4	450
5	492
6	540
7	620
8	690

- d) Apretar enter
  - e) Y volver a apretar enter
  - f) Se puede colocar la placa de 96 pozos y dar start para leer.
5. Para elegir otra forma de lectura
  - a) Apretar el botón “meas mode”.

- b) Con los botones “↑↓” elegir la opción deseada, por ejemplo si se desea que el aparato realice las lecturas de **absorbancias a diferentes tiempos con intervalos constantes** de lectura se elige la opción 4, es la del modo de lectura cinético o “kineticmode” y se aprieta “enter”
- c) aparece el tipo de filtro, el de inicio es 340 nm es decir el filtro 1. Al apretar enter aparece la leyenda en el monitor lag time, el inicial es 0.000, en el modo cinético se requiere la lectura de absorbencia a diferentes tiempos por lo que hay que colocar el tiempo deseado para tomar las lecturas, por ejemplo al colocar 1.000 minuto apretando “1” y luego “enter”;
- d) En la pantalla aparece al leyenda del tiempo total de lectura y se apreteta “enter”;
- e) Aparece “1 no reagent blank” si queremos seleccionar si alguna línea o columna tiene un blanco se puede elegir con los botones “↑↓” se selecciona la opción y se aprieta “enter”;
- f) Aparece en la pantalla “1 endresults” con los botones “↑↓” se selecciona “2 allresults” y luego “enter” y finalmente aparece la pantalla principal.

6. Para programar agitación de la placa,

- a) se presiona el botón “param” y con los botones “↑↓” se selecciona la opción “11 mixing” y luego “enter”.
- b) con los botones “↑↓” se selecciona el botón “2 mixing on” y luego “enter”;
- c) en la pantalla aparece el tiempo de mezclado, con los botones de número o con “↑↓” se programan los segundos que se deseen de mezclado
- d) se presiona el botón de “enter”; inmediatamente se regresa a la pantalla principal

7. Se coloca la placa en el aparato y para comenzar el ensayo se aprieta el botón “start”.

## **ANEXO II. Descripción De La Preparación De Geles De Poliacrilamida Nativos**

### *Reactivos y soluciones*

#### Solución de Acrilamida/Bisacrilamida 30:0.8

- 30% p/v de acrilamida
- 0.8% de bisacrilamida
  - Pesar 30 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida; adicionar agua c.b.p. 100 mL
  - **NOTA:** La solución de acrilamida/bisacrilamida debe ser usada durante un periodo máximo de 3 meses, por lo que no es recomendable preparar grandes volúmenes de esta solución.

#### Trizma base 2 M (pH = 8.8)

- Pesar 24.3 g y agregar aproximadamente 50 mL de agua destilada. Ajustar el pH con HCl y completar con agua hasta un volumen de 100 mL.

#### APS 10%

- Pesar 0.1 g de Persulfato de amonio y disolver en 1.0 mL de agua destilada y guardar a -20°C
  - **NOTA:** esta disolución no debe usarse por más de dos semanas.

#### Amortiguador de corrida

- Pesar 3g de Tris y 14.4 g de glicina, agregar agua destilada hasta completar un volumen de 1.0 L
  - **NOTA:** el amortiguador debe prepararse cada vez sea utilizado.

#### Buffer de muestra

- 312.5µL de 1 M Tris pH 6.8
- 500 µL de 100% glicerol
- 25µL de 20% azul de bromofenol



- 162.5µL de agua destilada

Primero se preparó el gel separador y se agregó 3 mL de mezcla entre las placas de vidrio de un espesor entre placas de 0.75 mm para la cámara de electroforesis BIO-RAD (Mini-PROTEAN® Tetra System), inmediatamente después de adicionar la mezcla se agregó un poco de agua para que la superficie quedara lo más plana posible (alrededor de 0.7 mL) y tardó aproximadamente 10 minutos en polimerizar. Una vez polimerizado el gel se retiró el agua y se secó con cuidado la superficie del gel con papel filtro y enseguida se añadió sobre el gel concentrador el gel separador, e inmediatamente se colocó el peine. Al cabo de aproximadamente 15 minutos el gel polimerizó y se retiró el peine y se lavaron con un poco de agua destilada, los pozos se secaron con pequeñas tiras de papel filtro. Una vez que los geles estuvieron hechos se montaron en la cámara de electroforesis y se prepararon las muestras y fueron cargadas en el gel.

## *PAGE-SDS*

### Amortiguador de corrida

- 200 mL de 5X amortiguador (0.25 N de Tris Base; 1.9 M de Glicina, 0.5% de SDS. En cantidades serían 30.285 g Tris; 142.62 g de Glicina y 5g de SDS, todo esto para un litro de disolución)
- 800 mL de agua destilada

### Buffer de muestra

- 350 µL de Tris base 1 M
- 250 µL de SDS al 20%
- 160 µL de ditioneitol (DTT) 1 M
- 150 µL de glicerol al 50%
- 20 µL de azul de bromofenol al 20%
- 70 µL de agua destilada

### Solución teñidora

- 0.125% p/v de azul de Coomassie R250
- 50% v/v de metanol
- 10% v/v de ácido acético

### Solución desteñidora

- 45% de metanol
- 10% de ácido acético

## **ANEXO III. Determinación De Proteína Por El Método De Bradford**

Para poder determinar la cantidad de proteína en las dos fracciones del extracto de embriones de maíz, primero se realizó una curva patrón con albúmina 0.1 mg/mL. A partir de la curva patrón, donde se graficó cantidad de proteína vs absorbancia a 595 nm, se obtuvieron la pendiente y la ordenada al origen de la regresión lineal de los datos y se calculó la concentración de proteína en cada una de las muestras sustituyendo la absorbancia en la ecuación siguiente:

$$[Proteína](\mu g/mL) = \left[ \left( \frac{Abs_{595nm} - b}{m} \right) / \mu L \text{ de muestra} \right] F$$

donde  $\mu L$  de muestra son los microlitos de muestra empleados en el ensayo y F es el factor de dilución de la muestra; b es la ordenada al origen de la ecuación de la curva patrón; y m es la pendiente. Las unidades resultantes son  $\mu g/\mu L$ .

### *Muestras de la planta:*

En primer lugar se hicieron las determinaciones de la cantidad de proteína en la planta, específicamente en raíz, tallo, hoja y espiga. Después de disecar las partes de la planta antes señaladas y de hacer la extracción de proteína se determinaron las concentraciones de proteína en cada muestra por el método de Bradford. Primero se realizó la curva patrón de BSA 0.1 mg/mL tomando diferentes volúmenes de BSA, es decir diferentes cantidades de proteína, y se midieron absorbancias a 595 nm en espectrofotómetro. De la gráfica de estos datos se obtuvo la regresión lineal cuya ecuación fue:

$$abs = 0.0149(\mu g) + 0.0083$$

donde ( $\mu g$ ) representa la cantidad de proteína de la muestra en microgramos, abs es la absorbancia medida en el espectrofotómetro, 0.0149 es el valor de la pendiente para esta curva patrón y 0.0083 es la ordenada al origen.

De esta ecuación se despejó la cantidad de proteína y después, la ecuación resultante se dividió entre los  $\mu L$  de muestra utilizado. Como la muestra no fue diluida, el factor de dilución es 1 en todos los casos. De esta manera se obtuvo la ecuación para calcular la concentración de proteína en cada muestra de la planta, sustituyendo el valor de absorbancia. Las determinaciones de las muestras de la planta se realizaron por triplicado y posteriormente se obtuvo el promedio de estas determinaciones para poder realizar los siguientes experimentos con cantidades de proteína más precisas.

$$[Proteína](\mu g/mL) = \left[ \left( \frac{Abs_{595nm} - 0.0083}{0.0149} \right) / \mu L \text{ de mtra} \right] 1$$

### *Muestras de embriones:*

Primero se realizó una curva patrón de BSA 0.1 mg/mL como se hizo en el caso de la planta de maíz y posteriormente las determinaciones de la cantidad de proteína en embriones de maíz. Después de haber germinado los embriones de maíz en agar con varios carbohidratos (glucosa, sacarosa y sorbitol) a concentraciones de 5 mM o 50 mM por 24 h a 29 °C y de hacer la extracción de proteína, se determinaron las concentraciones de proteína de los extractos de cada muestra por el método de Bradford, midiendo absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro. De la gráfica de estos datos se obtuvo la regresión lineal cuya ecuación fue:

$$abs = 0.0138(\mu g) + 0.1541$$

donde ( $\mu g$ ) representa la cantidad de proteína de la muestra en microgramos, abs es la absorbancia medida en el espectrofotómetro, 0.0138 es el valor de la pendiente para esta curva patrón y 0.1541 es la ordenada al origen.

La ecuación se despejó de la misma manera como en el caso de las muestras de la planta para obtener una ecuación con la que se pudo calcular la concentración de proteína para los embriones. Como la muestra no fue diluida, el factor de dilución es 1 en todos los casos. Las determinaciones de las muestras de embriones se realizaron por triplicado y posteriormente se obtuvo el promedio.

$$[Proteína](\mu g/mL) = \left[ \left( \frac{Abs_{595nm} - 0.1541}{0.0138} \right) / \mu L \text{ de mtra} \right] 1$$

## REFERENCIAS

1. Leszek P. V. D. *Zea mays* (Maize, Corn). Encyclopedia of life science (2002).
2. Bove J., Jullien M., Grappin P. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology* 3 (2001) 1002.1-1002.5
3. Nonogaki H., Bassel G.W., Bewley J.D. Germination-still a mystery. *Plant Science* 179 (2010) 574-581.
4. Claeysen E., Rivoal J. Isozymes of plant hexokinase: Occurrence, properties and functions. *Phytochemistry* 68 (2007) 709-731.
5. Dai N., Schaffer A., Petreikov M., *et al.* Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *The Plant Cell* 11 (1999) 1253-1266.
6. Rolland F., Winderickx J., Thevelein J.M. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences* 26 (2001) 310-317.
7. Zhang S., Nichols S.E., Dong J.G. Cloning and characterization of two fructokinases from maize. *Plant Science* 165 (2003) 1051-1058.
8. Martínez-Barajas E., Randall D.D. Purification and characterization of a glucokinase from young tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) fruit. *Planta* 205 (1998) 267-573.
9. Trethewey R.N., Geigenberger P., Riedel K. *et al.* Combined expression of glucokinase and invertase in potato tubers leads to a dramatic reduction in starch accumulation and a stimulation of glycolysis. *The Plant Journal* 15 (1998) 109-118.

10. Wilson J.E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *The Journal of Experimental Biology* 206 (2003) 2049-2057.
11. Da-Silva W. S., Rezende G. L., Galina A. Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *Journal of Experimental Botany* 359 (2001) 1191-1201.
12. Gonzali S., Alpi A., et al. Arabidopsis (HXK1 and HXK2) and yeast (HXK2) hexokinases overexpressed in transgenic lines are characterized by different catalytic properties. *Plant Science* 163 (2002) 943-954
13. Galina A., Reis M. et. al. Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *Biochemistry Journal* 309 (1995), 105-112
14. Lehninger A.L. *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* Omega (1972) 337, 338, 521, 522.
15. Frommer W.B., Schulze W.X., Lalonde S. Hexokinase, Jack-of-All-Trades. *Plant Science* 300 (2003) 261-263.
16. Pego J.V., Smeekens C.M. Plant fructokinases: a sweet family get-together. *Trends in Plant Science* 5 (2000) 531-536.
17. Guglielminetti L. et al. Characterization of isoforms of hexose kinases in rice embryo. *Phytochemistry* 53 (2000) 195-200.
18. Randez-Gil F., Sanz P., Entian K.D., Prieto J.A. Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-

- signaling response in yeast. *Molecular and Cellular Biology* 18 (1998) 2940-2948.
19. Karve, R., Lauria, M., Virnig, A., Xia, X., Rauh, B. L., & Moore, B. D. Evolutionary Lineages and Functional Diversification of Plant Hexokinases. *Molecular Plant* 3 (2010) 334–346.
20. Moore B., Zhou L., Rolland F., et al. Role of Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300 (2003) 332-336.
21. Cho, J. I., Ryoo, N., Eom, J. S., Lee, D. W., Kim, H. B., Jeong, S. W., y otros. Role of the Rice Hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as Glucose Sensors. *Plant Physiology* 149 (2009) 745-759.
22. Copeland L., Morell M. Hexose kinases from the plant cytosolic fraction of soybean nodules. *Plant Physiology* 79 (1985) 114-117.
23. KandelKfir M. *et al.* Two newly identified membrane-associated and plastidic tomato HXKs: characteristics, predicted structure and intreccellular. *Planta* 224 (2006) 1341-1352.
24. Baltrush S., Tiedge M. Glucokinase regulatory network in pancreatic  $\beta$ -cells and liver. *Diabetes* 55 (2006) S55-S64.
25. Mulichak A.M., Wilson J.E., *et al.* The structure of mammalian hexokinase-1. *Nature Structural Biology* 5 (1998) 555-560.
26. Van Schaftingen E., Detheux M., Da Cunha M. V. Short-term control of glucokinase activity: role of a regulatory protein. *The FASEB Journal* 8 (1994) 414-419.

27. Eckardt N.A. Programmed cell death in plants: A role for mitochondrial-Associated Hexokinases. *The Plant Cell* 18 (2006) 2097-2099.
28. Smeeckens S, Ma J, Hanson J, Rolland F. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* 13 (2010) 274–279.
29. Castañeda-Rico A. “Regulación de la actividad de hexocinasas por sacarosa y glucosa en la germinación de tejido embrionario de maíz”. Tesis de licenciatura para obtener el grado de Químico en Alimentos, Facultad de Química UNAM, 2008.
30. Rezende G.L., Meyer L., Machado L.B., *et al.* Partial purification of tightly bound mitochondrial hexokinase from maize (*Zea mays L.*) root membranes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39 (2006) 1159-1169.
31. Cárdenas M.L., Rabajille E., Neimeyer H. Suppression of kinetic cooperativity of hexokinase D (glucokinase) by competitive inhibitors. *European Journal of Biochemistry* 145 (1984) 163-171.
32. Harrington GN, Bush DR The bifunctional role of hexokinase in metabolism and glucose signaling. *Plant Cell* 15 (2003) 2493–2496
33. Petit T., Diderich J.A. *et al.* Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 182 (2000) 6815-6818.
34. Cho, Y. H., Yoo, S. D., & Sheen, J. Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase1 Complex in Glucose Signaling. *Cell* 127 (2006) 579–589.



35. Robey, R. B., & Hay, N. Mitochondrial Hexokinases Guardians of the Mitochondria. *Cell Cycle* 4 (2005) 654-658.
36. Schägger, H. and Jagow, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes. *Annual Biochemistry* 199 (1991) 223-231.
37. Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *The Journal of Experimental Biology* 206 (2003) 2049-2057.
38. Cox E.L., Dickinson D.B. Hexokinase from maize endosperm and scutellum. *Plant Physiology* 51 (1973) 960-966.
39. Matheson N.K., Myers D.K. Inhibition of germination by glucose analogues that are hexokinase substrates. *Phytochemistry* 48 (1998) 241-248.
40. Tiessen A., Prescha K., Branscheid A., *et al.* Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *The Plant Journal* 35 (2003) 490-500.
41. Pego J.V., Weisbeek P.J., Smeekens S.C.M. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiology* 119 (1999) 1017-1023.
42. Monasterio O., Cárdenas M.L. Kinetic studies of rat liver hexokinase D ("glucokinase") in non-co-operative conditions show an ordered mechanism with MgADP as the last product to be released. *Biochemistry Journal* 371 (2003) 29-38.

43. Cho JI, Ryoo N, Ko S, Lee SK, Lee J, Jung KH, Lee YH, Bhoo SH, Winderickx J, An G, et al. Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 224 (2006) 598–611.
44. Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57 (2006) 675–709.
45. Devlin TM (Ed) *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. New York a John Wiley & Sons, Inc., Publication 1997. 839-893. ISBN 0-471-15451-2.