

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

"IDENTIFICACIÓN DE LA(S) HEXOCINASA(S) SENSOR DE CARBOHIDRATOS EN MAÍZ"

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA: GIOVANNA PAULINA AGUILERA ALVARADO

TUTOR PRINCIPAL Dra. Sobeida Sánchez Nieto, Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR Dr. Ángel Arturo Guevara García, Instituto de Biotecnología, UNAM Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. Marzo, 2019



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.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El comité tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Ángel Arturo Guevara García	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM

Este proyecto fue apoyado por el financiamiento de CONACyT Proyectos 2396059 y 252001 para Apoyo y Fortalecimiento al Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica; y Facultad de Química Proyecto 50009125. Durante los estudios de doctorado gocé de las becas 25676 y 370274 otorgadas por CONACyT para la realización de la presente tesis.

Agradecimientos especiales para la Dra. Karina Jiménez Durán del Laboratorio de Microscopía Confocal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) de la Facultad de Química de la UNAM; a las M. en C. Beatriz King Díaz y Montserrat López Coria por su apoyo técnico y de análisis en la realización de la técnica de qRT-PCR.

Al jurado de examen de doctorado, por la exhaustiva revisión y las críticas realizadas a la presente tesis, el cual estuvo integrado por:

Presidente	Dra. Gladys Iliana Cassab López	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dra. Rocío Cruz Ortega	Instituto de Ecología, UNAM
Vocal	Dr. Eleazar Martínez Barajas	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM

IN	יוח	~E
114		чь.

I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCIÓN.	3
A. Glucosa: molécula señalizadora.	3
B. La HXK en las vias de señalización por Glu	5
1. Via de señalización dependiente de HXK.	6
2. Via de senalización dependiente de los intermediarios glucolíficos o via glucolífica.	9
C. Relevancia metabolica de la HXK y localización celular en plantas	. 10
I. HXKS TIPO A.	
2. HXKs fipo B.	12
3. HXKS TIPO C.	15
4. HXKS TIPO D.	10
D. Contribuciones de la HXK di desarrollo de la planta.	. 10
Germinación y establecimiento de la plantula. Deservelle ve gestative v repreductive	17
	10
5. Seriescericid y esires	20
	· ZI
	. 20
A Objetivo general	. 20
1 Objetivos particulares	· 20
	20 27
A Material vegetal	· 27
A. Malenar vegeral.	. 27
C. Clonación y construcción de plásmidos	. 27
D. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	. 20
E Determinación de proteína	30
E. Detección de las proteínas recombinantes	. 30
G Ensavo de actividad de HXK in vitro	. 00
H Ensavo de complementación en Saccharomyces cerevisiae	. 32
L localización subcelular de las proteínas de fusión ZmHXK:GFP en protoplastos de A. thaliana	. 33
L Ensavo de complementación en A thaliana (mutantes ain2-1 Moore et al. 2003)	. 34
K Análisis estadístico	35
I RT-PCR	. 00
VI RESULTADOS	. 38
A. Identificación de los miembros de la familia de HXKs de maíz con actividad catalítica	. 38
1. Análisis In silico.	
2. Caracterización bioauímica de las HXKs de maíz.	
3. Evaluación funcional de las HXK de maíz por expresión heteróloga en S. cerevisiae	47
B. Localización subcelular de las HXKs de maíz.	. 50
1. Predicción de la localización celular.	50
2. Expresión de las HXKs de maíz fusionadas a GFP	51
C. Complementación de la mutante A. thaliana ain 2-1 con las HXKs de maíz	. 55
D. Expresión de las HXKs de maíz durante el proceso de germinación	. 59
VII. DISCUSIÓN	. 61
VIII. CONCLUSIONES	. 71
IX. PERSPECTIVAS.	. 72
X. BIBLIOGRAFÍA.	. 73
XI. ANEXOS	. 80

ÍNDICE DE FIGURAS.

Fig. 1. Vías de señalización por Glu en plantas.	4
Fig. 2. Reacción catalizada por HXK.	5
Fig. 3. Mecanismo de represión de la expresión del gen CAB2 mediado por AtHXK1	7
Fig. 4. Localización celular de las HXKs en plantas.	.11
Fig. 5. Relevancia metabólica de las HXKs tipo A	.12
Fig. 6. Relevancia metabólica de las HXKs tipo B	.15
Fig. 7. Relevancia metabólica de las HXKs tipo C.	.16
Fig. 8. Participación de la HXK en las diferentes etapas del ciclo de vida de las plantas	.21
Fig. 9. Perfil de isoformas de HXK en maíz	.25
Fig. 10. Análisis filogenético de las HXKs de plantas.	.40
Fig. 11. SDS-PAGE y Western Blot de las versiones completas de las HXKs recombinantes de maíz	.41
Fig. 12. SDS-PAGE y Western Blot de las versiones truncas de las HXKs recombinantes de maíz	.43
Fig. 13. Curvas de saturación de la actividad de HXK con Glu como sustrato	.44
Fig. 14. Ensayo de complementación de la actividad de HXK en S. cerevisiae con las versiones nativ	vas
de las HXKs de maíz	.48
Fig. 15. Ensayo de complementación de la actividad de HXK en S. cerevisiae con las versiones trunc	cas
de las HXKs de maíz	.49
Fig. 16. HXKs de maíz localizadas en la mitocondria	.52
Fig. 17. HXKs de maíz localizadas en el citosol	.53
Fig. 18. La región del N-terminal dirige a las HXKs de maíz a la mitocondria	.54
Fig. 19. Expresión de AtHXK1 y las diferentes HXKs de maíz en plantas silvestres y en mutantes gin 2-1	.55
Fig. 20. Evaluación fenotípica de las líneas mutantes gin 2-1 complementadas con las diferentes HXKs	de
maíz	.57
Fig. 21. Evaluación de la expresión del gen CAB2 en las líneas mutantes gin 2-1 complementadas con	las
diferentes HXKs de maiz.	.58
Fig. 22. Perfiles de expresión de las HXKs verdaderas de maíz durante la germinación.	.60
Fig. S23. Alineamiento múltiple de secuencias de los dominios conservados e importantes para la catá	lisis
en las HXKs de A. thaliana, arroz y maiz.	.84
Fig. S24. Análisis de las secuencias del extremo N-terminal de las diferentes familias de HXKs de A. <i>thaliai</i>	na,
arroz y maiz.	.84
Fig. 525. Curvas de saturación de la actividad de ZMHXK4 Δ 30-6 Δ 30 y ZMHXK9 Δ 30 con Fru, Man y A	
COMO SUSTICIOS.	.84
Fig. 526. Cuivas de saturación de la actividad de ZMHXK/-8 con Fiu, Man y AIP como susiraros	.84
Fig. 527. Electos infilipitorios de ADF, NAG y GoF sobre la actividad de las HARS de maiz.	.04
rig. 320. remiles de expresión de las direrentes mixis de maiz mondas y completas en las cep	
Fig. \$29. Localización subcelular de las HYKs de maíz	.04 Q1
Fig. S20. Percentaio de plántulas establocidas en agar suplementado con Clubal 200	.04 Q1
ng. 350. i orcentaje de plantolas establecidas en agai suplementado con Giu di 2%	.04

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Nombre y número de genes, localización celular, propiedades bioquímicas y como sens	sor de
Glu de diferentes HXKs de plantas	22
Tabla 2. Lista de cebadores utilizados para la clonación	28
Tabla 3. Lista de cebadores utilizados para la subclonación	29
Tabla 4. Mezcla de transformación "T-mix"	33
Tabla 5. Soluciones utilizadas para la preparación de protoplastos.	34
Tabla 6. Lista de cebadores utilizados para la detección	36
Tabla 7. Condiciones de PCR para la detección de las HXKs de maíz	37
Tabla 8. Comparación de los parámetros cinéticos de las HXKs de maíz	45
Tabla 9. Comparación de los valores de IC50 de ADP, G6P y NAG para las diferentes HXKs de maíz	<u>v</u> 47
Tabla 10. Predicción de la localización celular de las HXKs de maíz	51
Tabla \$11. Números de acceso de los genes de las diferentes familias de HXKs de plantas	80
Tabla \$12. Porcentaje de identidad entre los diferentes miembros de la familia de HXK de maíz	82
Tabla \$13. Comparación de los aminoácidos en dominios conservados y/o regiones importantes p	ara la
actividad catalítica en HXKs de maíz y AtHXK1 (Karve et al., 2008)	83

RESUMEN

I. RESUMEN.

La hexocinasa (HXK) es la única enzima en plantas capaz de fosforilar glucosa (Glu). Además, actúa como una proteína sensor de Glu regulando el crecimiento y desarrollo de la planta. En maíz, la información que se tiene acerca de la familia de genes de HXK es escasa. Hasta ahora se sabe que está compuesta por nueve miembros, de los cuáles ninguno ha sido caracterizado individualmente. En el presente estudio se identificaron seis de las nueve HXKs de maíz que tienen un grado elevado de similitud con otras HXKs de plantas con actividad enzimática y se logró caracterizarlas bioquímica y funcionalmente. Los parámetros cinéticos obtenidos de las proteínas recombinantes ZmHXK4-8 (ZmHXK9 no mostró actividad in vitro) permitieron clasificarlas en dos grupos: HXKs con alta o baja afinidad a Glu al igual que la sensibilidad a diferentes inhibidores (sensibles o insensibles). Las isoformas ZmHXK4-8 complementaron eficientemente la mutante de levadura carente de actividad de HXK, confirmando su función enzimática mientras que ZmHXK9 mostró una actividad marginal (in vivo). Por otro lado, se encontró que ZmHXK4-6 y ZmHXK9 son proteínas mitocondriales cuya localización subcelular está dirigida por los primeros 30 aminoácidos del dominio N-terminal en tanto que ZmHXK7 y ZmHXK8 se localizan en el citosol. Además, la expresión de ZmHXK4-8 en la mutante de Arabidopsis gin 2-1 restauró el fenotipo de crecimiento de la planta silvestre en un medio suplementado con Glu y a nivel molecular, ZmHXK4-9 fueron capaces de reprimir la expresión del gen CAB2 en presencia de concentraciones elevadas de Glu. Con base en todo lo anterior se demostró que, en maíz, todas las HXKs que poseen actividad catalítica también tienen actividad como sensor de Glu. Es necesario realizar más estudios para identificar funciones particulares, si las hay, de cada una de las HXKs aquí descritas.

RESUMEN

ABSTRACT.

Hexokinase (HXK) is the only enzyme in plants that phosphorylates glucose (Glu) and is also a Glc sensor protein that regulates plant development and growth. In maize, nine genes comprise the HXK family. In the present study, we identified maize HXKs that have high sequence similarity to other enzymatically active HXKs and provide detailed biochemical and functional characterization of them. The kinetic parameters of recombinant proteins for ZmHXK4-8 (ZmHXK9 didn't show in vitro activity) revealed two groups of HXKs: enzymes with high and low affinity to Glu as well as sensitivity to different inhibitors. The ZmHXK4-8 isoforms efficiently complemented a yeast mutant which lacks HXK activity and confirmed their enzymatic function, whereas ZmHXK9 showed marginal activity (in vivo). Moreover, ZmHXK4-6 and ZmHXK9 are mitochondrial proteins, the localization of which greatly relies on the first 30 amino acids of the N-terminal domain, whereas ZmHXK7-8 are constitutively located in the cytosol. Furthermore, expression of ZmHXK4-8 in the Arabidopsis null mutant gin2-1 background restored wild-type growth in Glu supplemented medium and at molecular level, ZmHXK4-9 were able to repress CAB2 gene expression at high Glu levels. This evidence suggests that in maize, all catalytic HXKs have the Glu sensor function. Further studies are necessary to reveal the specific physiological role of each one of these isoforms.

II. INTRODUCCIÓN.

A. Glucosa: molécula señalizadora.

Además de ser la principal fuente de C y energía para las células los carbohidratos también actúan como moléculas señalizadoras que intervienen en la regulación de distintos procesos celulares a lo largo del ciclo de vida de las plantas (Rolland, Baena-Gonzalez & Sheen, 2006; Ramon, Rolland & Sheen, 2008; Sheen, 2014; Li & Sheen, 2016). El hecho de que las plantas sean capaces de producir sus propios carbohidratos en tejidos fotosintéticamente activos (tejidos fuente) para nutrir a otros tejidos no fotosintéticos (tejidos demanda), hace que los procesos de señalización por carbohidratos sean una actividad muy compleja que requiere de elementos reguladores que sean capaces de percibir cambios en concentraciones entre diferentes tejidos, compartimientos celulares y etapas del desarrollo. La glucosa (Glu) es la fuente de energía y C empleada por la mayoría de los organismos (Cárdenas, Cornish-Bowden & Ureta, 1998) y en plantas es el carbohidrato más estudiado debido a la gran cantidad de efectos que provoca durante todas las etapas de su desarrollo (Ramon, Rolland & Sheen, 2008; Sheen, 2014; Li & Sheen, 2014; Li & Sheen, 2016).

Por ejemplo, se ha comprobado que la Glu en concentraciones elevadas (alrededor de 300 mM) inhibe el proceso de germinación, retarda la expansión del cotiledón, el crecimiento del tallo y la elongación del hipocótilo de A. *thaliana* (Jang et al., 1997; Arenas-Huertero et al., 2000; Moore et al., 2003) y que durante la embriogénesis, este monosacárido promueve la división celular (Rolland, Baena-Gonzalez & Sheen, 2006).

Además, a través de diversos ensayos farmacológicos y análisis transcriptómicos se ha demostrado que más de 2000 genes de plantas, de toda clase pero principalmente factores de transcripción, son regulados por Glu (Sheen, 1990; Graham, Denby & Leaver, 1994; Jang & Sheen, 1994; Xiao, Sheen & Jang, 2000; Price, Laxmi & Jang, 2004; Villadsen & Smith, 2004; Xiong *et al.*, 2013). La regulación de algunos de estos genes depende del metabolismo de Glu mientras que, la de otros no. El uso de análogos no metabolizables de Glu, como la 3-O-metilglucosa (30MG), la 2-desoxiglucosa (2DOG), la 6-desoxiglucosa (6DOG) y la manosa (Man), permite hacer esta distinción (Fig. 1); sin embargo, hasta la fecha únicamente existen un par de reportes que combinan el uso de análogos de Glu y análisis transcriptómicos para identificar qué grupos de genes responden a Glu por efecto metabólico y cuáles por

mecanismos de señalización (Price, Laxmi & Jang, 2004; Villadsen & Smith, 2004). En uno de estos estudios, plántulas de A. *thaliana* fueron tratadas con 3OMG y 6DOG, ambos análogos de Glu son transportados al interior de la célula pero no metabolizados (Fig. 1), y estos no modificaron la expresión de genes de la planta (Villadsen & Smith, 2004). En otro estudio, se utilizó la 3OMG, tratamiento que los autores utilizaron como control osmótico y tampoco se identificaron genes que modificaran su expresión en presencia de este análogo y Glu (Price, Laxmi & Jang, 2004). En conjunto, estos estudios indican que la toma de Glu es insuficiente para provocar una señal dentro de la célula (Price, Laxmi & Jang, 2004) y que se requieren de otros elementos que sean capaces de transducir las señales emitidas por los carbohidratos, como por ejemplo, la Hexocinasa (HXK) que fue el primer sensor de Glu identificado en plantas (Jang *et al.*, 1997).



Fig. 1. Vías de señalización por Glu en plantas.

Diferentes análogos no metabolizables de Glu se han utilizado para distinguir las vías de señalización de Glu en las que participa la HXK. En la vía de señalización dependiente de glucólisis dichos análogos tienen un efecto menor o nulo respecto al provocado por Glu y el papel de la HXK puede ser soportado por la actividad de otras HKXs, por ejemplo, la de levadura ScHxk2. Por otro lado, en la vía que involucra la función sensor de HXK estos análogos tienen el mismo efecto que la Glu. Tomada de Aguilera-Alvarado & Sánchez-Nieto, 2017.

B. La HXK en las vías de señalización por Glu.

La HXK, es una enzima glucolítica reguladora, que cataliza la reacción irreversible de fosforilación de D-hexosas en la posición seis, usando ATP como donador del grupo fosfato (Fig. 2). Esta enzima es capaz de fosforilar varias hexosas, incluyendo Glu, Fructosa (Fru), Man y en plantas tiene la particularidad de ser la única enzima capaz de fosforilar Glu en la posición seis, puesto que hasta el momento no se han identificado Glucocinasas (Claeyssen & Rivoal, 2007).





Debido a la actividad catalítica que posee, la HXK es capaz de regular el flujo de la vía glucolítica y de suministrar sustratos para otras vías metabólicas como la vía oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP, por sus siglas en inglés), la síntesis de almidón, la síntesis de ácidos grasos y la síntesis de azúcares de nucleótidos (Claeyssen & Rivoal, 2007). Además de la Glu, algunos derivados metabólicos producidos en las vías antes mencionadas también son capaces de influir en el desarrollo de la planta, afectando la transcripción de algunos genes a través de la vía de señalización glucolítica o metabólica y que depende de la actividad catalítica de la HXK (Fig. 1). Además de esta actividad catalítica, la HXK posee una actividad como sensor, es decir percibe los cambios en la concentración de Glu dentro de la célula y transduce la señal modificando la expresión de varios genes (Jang *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2003; Cho, Yoo & Sheen, 2006; Rolland, Baena-Gonzalez & Sheen, 2006; Ramon, Rolland & Sheen, 2008; Cho *et al.*, 2009).

1. Vía de señalización dependiente de HXK.

Los primeros experimentos que evidenciaron que la HXK tenía un papel regulatorio en el desarrollo en las plantas se hicieron con análogos de la Glu como la Man y la 2DOG, ambas moléculas son transportados al interior de la célula, fosforiladas por la HXK, pero pobremente metabolizados luego de esta reacción (Fig. 1). Se encontró que, al igual que la Glu, estos compuestos fueron capaces de provocar una drástica disminución en la expresión de genes como el de la malato sintasa (*MS*), la isocitrato liasa (*ICL*), la subunidad pequeña de la rubisco (*RBCS*), la piruvato fosfato dicinasa (*PPDK*) y la proteína de unión a clorofila a/b (CAB) (Graham et al. 1994; Jang & Sheen 1994) sugiriendo que la fosforilación de hexosas por acción de la HXK era indispensable para la regulación de estos genes en presencia de Glu y que probablemente existía una vía de señalización por Glu que no dependía del subsecuente metabolismo de esta; el estudio de plantas sobreexpresoras y silenciadas de la HXK1 de A. *thaliana* reforzó esta hipótesis (Jang *et al.* 1997).

Posteriormente, la caracterización de la mutante nula de AtHXK1 (gin 2-1) demostró la existencia de una vía de señalización mediada por HXK1 y que es independiente de la glucólisis. En dicha mutante, se observó hiposensibilidad a concentraciones elevadas de Glu durante el establecimiento de la plántula y en general, defectos en el crecimiento tanto a nivel reproductivo como vegetativo. A nivel molecular, la capacidad de fosforilar a la Glu se redujo aproximadamente 50%, sin embargo, el contenido de hexosas-6-fosfato no disminuyó, indicando que los defectos observados no se debían a una deficiencia de hexosas fosforiladas y por lo tanto no estaban relacionados con la actividad catalítica de la HXK. Para confirmar que se había separado la función catalítica de la señalizadora, Moore y colaboradores (2003) produjeron dos variantes catalíticas de la proteína AtHXK1 que son capaces de unirse a la Glu pero no de fosforilarla (G104D y \$177A) y se llevaron a cabo ensayos de complementación, en los cuáles se encontró que tanto la versión nativa de AtHXK1 como las variantes catalíticas eran capaces de restablecer el fenotipo silvestre en las mutantes gin 2-1 (Moore et al., 2003) demostrando que la HXK es una proteína "moonlighting", sensor de la abundancia de Glu que promueve el crecimiento de la planta mediante un proceso que no requiere de su actividad catalítica (Moore et al., 2003). Estos ensayos de complementación en conjunto con la evaluación de la represión de algunos genes fotosintéticos como CAB2, sedoheptulosa

bifosfatasa (SBP) y anhidrasa carbónica (CAA); se han convertido en experimentos clave para la evaluación de la función sensor de las HXKs en plantas.

En el caso particular del gen CAB2 ya se ha esclarecido como es que la HXK1 regula su expresión. Cuando la concentración de Glu dentro de la célula es elevada, la proteína AtHXK1 forma un complejo con la subunidad B1 de la ATPasa vacuolar (VHA-B1) y la subunidad 26S de la partícula regulatoria del proteosoma (RPT5B); este complejo se encuentra en el núcleo y se une a la región promotora del gen CAB2 reprimiendo su expresión (Fig. 3; Cho, Yoo & Sheen, 2006). Aún se desconoce dónde se ensambla el complejo y como llega al núcleo. Los otros genes fotosintéticos que se conoce son regulados por la vía dependiente de la HXK podrían estarse regulando de la misma manera o bien, a través de la formación de otros complejos proteicos distintos, sin embargo, no existe evidencia experimental de esto.



Fig. 3. Mecanismo de represión de la expresión del gen CAB2 mediado por AtHXK1.

El mecanismo mediante el cual AtHXK1 controla la expresión del gen CAB2 depende de la concentración de Glu en la célula. A) Cuando la concentración de Glu es baja, el gen CAB2 se encuentra "encendido". B) Cuando la concentración de Glu es excesiva, es percibida por AtHXK1 lo que provoca un cambio conformacional y la subsecuente formación del complejo represor AtHXK1/VHA-B1/RPT5B, se desconoce el mecanismo por el cual el complejo se encuentra en el núcleo, pero ya en el núcleo se une a través de dos factores de transcripción a la región promotora de CAB2 para inhibir su expresión. Tomado y modificado de Bolouri-Moghaddam et al., 2010.

Las estrategias experimentales descritas han permitido demostrar que la función sensor de la HXK es una actividad conservada en plantas (Cho, J. I.; Ryoo, N.; Hahn, T. R.; Jeon, 2009; Karve *et al.*, 2010). Por ejemplo, en *Solanum tuberosum, Nicotiana tabacum y Oryza sativa* se han identificado proteínas que, además de poseer actividad catalítica también son capaces de complementar la deficiencia de la proteína HXK1 en A. *thaliana* (Veramendi *et al.*, 1999, 2002; Cho *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013, 2016).

Además, no sólo los genes involucrados en el metabolismo de C son blanco de la represión vía HXK, también se han reportado genes que participan en el transporte de carbohidratos. Tales son los casos del translocador de triosas fosfato en trigo (TTP), el transportador de hexosas VvHT1 en uva y el transportador de monosacáridos STP10 en A. thaliana, los tres genes son reprimidos por Glu, 2DOG o Man y este efecto represor se pierde al agregar inhibidores de la actividad de HXK o bien, al eliminar la expresión de esta (Conde et al., 2006; Sun et al., 2006; Rottmann et al., 2016). Se ha propuesto que la reducción en la expresión de los transportadores de Glu permite controlar su disponibilidad a una edad, tejido o etapa del desarrollo determinada afectando la fisiología de la planta (Price, Laxmi & Jang, 2004)

Cabe mencionar que la función sensor de la HXK no sólo provoca la represión de genes, sino que también puede ocasionar inducción. Recientemente, se demostró que en A. *thaliana*, la Glu induce la biosíntesis de glucosinolatos que son metabolitos secundarios conjugados con Glu. Por lo general estos compuestos carecen de actividad biológica pero la ruptura del enlace glucosídico libera al compuesto bioactivo. Esta inducción se logra a través de la estimulación de la expresión de genes que codifican para proteínas que participan en su biosíntesis como CYP81F2/3/4, CYP79B2, CYP83B1 y los factores de transcripción MYB34, MYB51 y MYB122 y se demostró que depende de la actividad sensor de la HXK puesto que en las mutantes *gin2-1* se pierde este efecto inductor (Miao *et al.*, 2016).

Por otro lado, a pesar de que la mayoría de las HXKs con función de sensor tienen como característica común la función catalítica (Dai *et al.*, 1999; Veramendi *et al.*, 2002; Giegé *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2006; Kano *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013), se ha propuesto que otro grupo de proteínas estructuralmente muy parecidas a las HXKs pero que carecen de actividad de cinasa, denominadas las HXK-like (HKL), también pueden actuar como sensores. La sobreexpresión de la proteína AtHKL1 ocasionó una reducción en el tamaño de la planta y particularmente en el crecimiento del hipocótilo (Karve & Moore, 2009). Además, se demostró

que AtHKL1 puede interactuar con AtHXK1 en la mitocondria y atenuar la capacidad que tiene esta proteína de promover el desarrollo de los pelos radiculares y arrestar el desarrollo de la plántula, además de actuar como un efector positivo en algunas interacciones entre las vías de señalización de etileno y carbohidratos, pero no se tiene más información acerca del mecanismo molecular mediante el cual ocurren estos eventos o bien, si otras HKL de plantas cumplen funciones similares (Karve, Xia & Moore, 2012). Recientemente, gracias al análisis de la estructura cristalográfica de AtHXK1 (PDB 4QS7 y 4QS8, formas unidas y libres de Glu, respectivamente) y una versión catalíticamente inactiva (S177A, PDB 4QS9) se ha propuesto que la función sensor podría estar relacionada con la elevada afinidad a Glu (Feng *et al.* 2015). Sin embargo, hasta ahora no es claro cómo los cambios conformacionales inducidos por Glu en la HXK provocan que esta sea capaz de propagar la señal de abundancia de Glu.

2. Vía de señalización dependiente de los intermediarios glucolíticos o vía glucolítica.

Esta vía depende de la actividad catalítica de HXK y en este caso, el uso de análogos no metabolizables provoca un efecto menor o nulo sobre la expresión de algunos genes con respecto a la Glu y el papel de la HXK puede ser soportado por la actividad de otras HXKs, por ejemplo la de levadura ScHxk2 (Xiao, Sheen & Jang, 2000; Rolland, Baena-Gonzalez & Sheen, 2006; Ramon, Rolland & Sheen, 2008). Los genes regulados por esta vía se ven afectados por los intermediarios metabólicos de la glucólisis (Fig. 1).

Los primeros genes reportados que dependen de esta vía fueron *PR1* y *PR5*, los cuales codifican para proteínas de respuesta involucradas en la defensa de la planta y que se inducen en presencia de patógenos. Azúcares como sacarosa (Sac), Glu y Fru provocaron este mismo efecto sobre su expresión (Xiao, Sheen & Jang, 2000).

También algunos de los genes relacionados con el metabolismo del N son regulados por esta vía. Por ejemplo, en A. *thaliana* los genes NRT2.1, NRT2.4, NRT1.1 y NRT1.5. pertenecientes a la familia de transportadores de NO³⁻, son inducibles por carbohidratos y los análogos no metabolizables así como la inhibición de la actividad de HXK, provocan represión en su expresión, contrario al efecto de la Glu (Lejay *et al.*, 2003, 2008). Igualmente en A. *thaliana*, la expresión del gen NIA1 en raíces es estimulada por Sac y Glu, y se sugiere que este mecanismo de regulación de la expresión depende de los niveles de Glu-6-fosfato (G6P) y Fru-6-fosfato

(F6P) generados por la reacción catalizada por la HXK (Reda, 2015). El efecto de los azúcares sobre la expresión de genes relacionados con el metabolismo de N explica, en parte, porqué la disponibilidad de C (en exceso o limitada) tiene impacto sobre el uso del N, afectando el crecimiento y la productividad de la planta (Price, Laxmi & Jang, 2004). Finalmente, la inducción de los genes *FLZ1*, *FLZ2*, *FLZ8* y *FLZ10*, pertenecientes a una familia de proteínas implicadas en la regulación de varios estrés de tipo biótico o abiótico, también depende de la actividad de HXK y la subsecuente oxidación de la G6P producida (Jamsheer & Laxmi, 2015). En general, acerca de esta vía se sabe que la abundancia de Glu es percibida como un estado de abundancia nutricional y energética, y que la HXK no solo afecta la respuesta celular, sino que también interviene en la vía de señalización mediada por la proteína blanco de rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés). La vía de TOR es inducida por intermediarios metabólicos de la glucólisis lo que indica una conexión con la actividad catalítica de HXK y no con su actividad sensor (Price, Laxmi & Jang, 2004; Villadsen & Smith, 2004; Xiong *et al.*, 2013); sin embargo es necesario que se lleven a cabo análisis más detallados para dilucidar por completo la conexión entre la vía glucolítica de pendiente de HXK y la mediada por TOR.

C. Relevancia metabólica de la HXK y localización celular en plantas.

Otro aspecto importante de las HXKs es su localización celular, dependiendo de esta dichas enzimas tendrán un acceso a niveles y tipos de sustratos distintos, lo que puede impactar en el flujo de las diferentes vías metabólicas y/o de señalización de Glu y que puede ser determinante en la fisiología de las plantas. Con base en la secuencia del extremo N-terminal, la cual dicta la localización celular de las HXKs, en plantas, estas proteínas se pueden clasificar en cuatro tipos (Fig. 4) los cuales se describen a continuación.





1. HXKs tipo A.

Contienen un péptido señal de aproximadamente 30 aminoácidos que las dirige al cloroplasto (Fig. 5). Son poco comunes puesto que no se encuentran presentes en todas las familias de HXKs de plantas hasta ahora caracterizadas; sólo se han identificado en el musgo *Physcomitrella patens* y en plantas como A. *thaliana*, N. *tabacum*, O. *sativa*, *Spinacea oleracea*, *Solanum lycopersicum* y *Vitis vinifera* (Olsson, Thelander & Ronne, 2003; Cho *et al.*, 2006; Kandel-Kfir *et al.*, 2006; Karve *et al.*, 2008, 2010; Nilsson *et al.*, 2011). Dado que los métodos predictivos no han identificado HXKs tipo A en plantas como maíz o sorgo (plantas C₄) se ha sugerido que estas enzimas solo están presentes en plantas que tienden a acumular grandes cantidades de almidón (Karve *et al.*, 2010).

Pocos trabajos han descrito la relevancia de las HXKs tipo A. En general se piensa que estas enzimas podrían ser importantes para la fosforilación de la Glu proveniente de la degradación del almidón y la incorporación de la G6P a vías metabólicas tales como la OPPP o la síntesis de ácidos grasos, particularmente cuando el suministro de energía es limitado por ejemplo, durante la noche o en los tejidos demandantes; o bien se cree que podrían estar involucradas en la fosforilación de Glu importada al cloroplasto para la síntesis de almidón según se observa

en la Fig. 5 (Veramendi et al., 1999; Olsson, Thelander & Ronne, 2003; Giese et al., 2005; Cho et al., 2006; Kandel-Kfir et al., 2006). Es posible que estas enzimas puedan poseer también una actividad sensor. La mutante de A. *thaliana, phxk,* carente de la proteína plastídica AtHXK3, pierde la capacidad de reprimir la expresión del gen fotosintético LHCB y ya que esta isoforma tiene muy poca actividad, se propone que AtHXK3 es requerida para la señalización por azúcares en el plastidio (Karve et al., 2008; Zhang et al., 2010).



Fig. 5. Relevancia metabólica de las HXKs tipo A.

Este tipo de HXKs se cree que son relevantes para el metabolismo de almidón y la generación de sustratos para otras vías como la OPPP y la síntesis de ácidos grasos en el plastidio. G1P: Glu-1-fosfato.

2. HXKs tipo B.

Presentan un dominio de alrededor de 24 aminoácidos altamente hidrofóbicos que las anclan a la membrana externa mitocondrial, aunque también pueden localizarse en otros compartimentos celulares como el núcleo. Además, un gran número de este tipo de HXKs se caracterizan por ser sensibles a la inhibición por ADP, N-acetil glucosamina (NAG) y manoheptulosa (Galina *et al.*, 1995; Yanagisawa, Yoo & Sheen, 2003; Cho, Yoo & Sheen, 2006; Balasubramanian et al., 2007; Camacho-Pereira et al., 2009; Cheng et al., 2011; Nilsson et al., 2011).

A diferencia de la información disponible respecto a las HXKs tipo A, para el caso de las del tipo B existen una amplia gama de investigaciones con relación a las funciones de estas isoformas (Fig. 6). Se ha demostrado que AtHXK1 y AtHXK2 forman parte de un metabolón que hace más eficiente el uso de la Glu a través de la glucólisis ya que se restringe la pérdida de metabolitos que podrían funcionar como sustratos para otras vías metabólicas (Graham *et al.*, 2007). En el betabel (*Beta vulgaris*), se propone que ocurre algo similar y que también se presenta un fenómeno de "channeling" del ATP proveniente de la mitocondria y uno de reciclaje del ADP generado por la reacción catalizada por las HXKs mitocondriales, con la finalidad de hacer más efectiva la respiración (Alcántar-Aguirre *et al.*, 2013).

De igual forma, se ha corroborado que las HXKs tipo B está implicada en procesos como la muerte celular programada y la generación de especies reactivas de oxígeno. En *N. bethamiana* el silenciamiento mediante VIGS de una isoforma de HXK mitocondrial provocó la inducción de la muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés). En este estudio se demostró que es fundamental la actividad de HXK mitocondrial para prevenir los efectos provocados por el H₂O₂ como la liberación de citocromo c y la ruptura del potencial de membrana (Kim *et al.*, 2006).

En papa se ha observado algo similar, la localización mitocondrial de HXK es esencial para estimular el reciclaje de ADP, incrementar el consumo de O₂, disminuir el potencial de membrana y la liberación de H₂O₂ y en consecuencia los daños provocados por este agente oxidante (Camacho-Pereira *et al.*, 2009). Ambos estudios sugieren fuertemente que tanto la localización mitocondrial como la actividad de HXK son necesarios para proteger a la célula vegetal contra los efectos provocados por las ROS, comparable a lo que ocurre en mamíferos (Sun *et al.*, 2008).

Asimismo, se ha propuesto que las HXKs del tipo B, confieren protección en contra del ataque de patógenos. En arroz, la fosforilación de la D-alosa mediada por HXKs mitocondriales, induce una acumulación de ROS, estimula la expresión de los genes PR, incrementa la resistencia a *Xanthomonas oryzae* y minimiza la formación de lesiones causada por este patógeno (Kano *et al.*, 2013) y en N. benthamiana, plantas que sobreexpresaron las proteínas AtHXK1 y AtHXK2

fueron más resistentes al ataque por el hongo patógeno Alternaria brassicicola, que se asoció a un incremento en la producción de H₂O₂ y a la inducción del gen PR1 (Sarowar *et al.*, 2008).

En contraste, también se ha demostrado que la HXK podría actuar como un estimulante de la PCD. En A. *thaliana* la mutante *mips1* que carece de la proteína mioinositol 1-fosfato sintasa (MIPS, por sus siglas en inglés), la cual es la enzima que cataliza el paso limitante para la síntesis de mioinositol, presenta un fenómeno de formación espontánea de lesiones en condiciones de día largo. Se demostró que la actividad catalítica de HXK es requerida para el establecimiento de estas lesiones, ya que una mutación en un residuo crítico para la unión de Glu (T2311) evita la formación de estas heridas. Los autores postulan que HXK1 altera el contenido de mioinositol actuando de manera coordinada con MIPS1 y MIPS2 (Bruggeman *et al.*, 2015). Estos resultados indican que las HXKs pueden actuar como moduladores positivos o negativos de la PCD. Es posible entonces que el estado metabólico de la célula, las condiciones ambientales o bien, algún otro elemento aún no identificado influya sobre el papel que la HXK debe ejercer en el proceso de PCD.

Respecto a la función como sensor de la abundancia de Glu, anteriormente se creía que únicamente las HXKs tipo B eran las que poseían la actividad sensor puesto que también pueden localizarse en el núcleo, sin embargo, recientemente se ha aclarado que esta función es independiente de la localización celular (Ryu *et al.*, 2008; Karve *et al.*, 2010; Sheen, 2014; Kim *et al.*, 2016).



Fig. 6. Relevancia metabólica de las HXKs tipo B.

Este tipo de HXKs son importantes para el metabolismo central de C y para procesos relacionados con la PCD. A6P: Alosa-6fosfato; VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje, ANT: Translocador de adenin nucleótidos; MPC: Acarreador mitocondrial de piruvato.

3. HXKs tipo C.

Esta clase de HXKs carece de péptido de anclaje o péptido señal y son citosólicas. Al igual que las tipo A, no son tan abundantes. Se cree que sólo están presentes en monocotiledóneas y que su principal función es la de fosforilar a la Glu exportada del cloroplasto proveniente de la degradación del almidón (Karve *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2011; Nilsson *et al.*, 2011). Adicionalmente, debido a que no son susceptibles a la inhibición por ADP, se propone que son esenciales para el funcionamiento de la glucólisis (Fig. 7) (da-Silva, Rezende & Galina, 2001; Kim *et al.*, 2016). Este tipo de HXKs también se han localizado en núcleo y pueden acarrear además de la actividad catalítica la función de sensor, tal es el caso de la OsHXK7 de arroz (Karve *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2016).



Fig. 7. Relevancia metabólica de las HXKs tipo C.

Este tipo de HXKs se cree que son importantes para el metabolismo central de C en condiciones de hipoxia, para el metabolismo de almidón y la generación de sustratos para otras vías como la OPPP y la síntesis de ácidos grasos en el plastidio.

4. HXKs tipo D.

Estas HXKs, también son de localización mitocondrial y contienen un péptido de anclaje de alrededor de 24 aminoácidos, sin embargo, esta secuencia difiere de las de las HXKs tipo B (Nilsson *et al.*, 2011). Sólo han sido encontradas en un musgo y se insinúa que por la coincidencia en localización celular podrían tener funciones similares a las de las tipo B, pero hasta el momento esto no ha sido demostrado (Nilsson *et al.*, 2011).

D. Contribuciones de la HXK al desarrollo de la planta.

Tanto la actividad catalítica de la HXK, así como su función de sensor de Glu, repercuten en la fisiología de la planta a lo largo de todo su ciclo de vida. Existe evidencia de que las vías de señalización por Glu en las que interviene la HXK se entrecruzan con algunas vías de señalización mediadas por hormonas como auxinas (AUX), ácido abscísico (ABA), ácido giberélico (GA), brasinosteroides (BR) e incluso con el regulador del crecimiento melatonina. A

continuación, se describe brevemente la intervención de la HXK en algunas etapas del ciclo de vida de las plantas (Aguilera-Alvarado & Sánchez-Nieto, 2017).

1. Germinación y establecimiento de la plántula.

Una de las etapas del desarrollo más importantes de la planta y que determina la productividad de la misma es la germinación, la cual puede ser inhibida por análogos no metabolizables de la Glu que actúan como sustrato de la HXK (Matheson & Myerst, 1998). En arroz, mutantes nulas y con deficiencia catalítica de la HXK7 mostraron retraso en la germinación respecto a la planta silvestre. Por el contrario, plantas mutantes que sobreexpresaron OsHXK7 mostraron tasas más rápidas de crecimiento y de elongación de coleóptilos respecto a los controles. Estos resultados indican que OsHXK7 se requiere para una germinación eficiente, probablemente promoviendo la fermentación dependiente de glucólisis bajo condiciones de deficiencia de O₂ (Matheson & Myerst, 1998; Kim et al., 2016). Por otro lado, en A. thaliana, la expresión del gen AtGASA6 es reprimida por Glu (6%), ABA y un inhibidor de la síntesis de GA. AtGASA6 es una proteína membranal que regula la elongación celular y del eje embrionario a través de la expansina AtEXP1 (Zhong et al., 2015). Sin embargo, en las mutantes gin2-1 el efecto represor de la Glu se pierde, indicando que la represión de AtGASA6 por Glu es mediada por AtHXK1 (Zhong et al., 2015). Es probable que el efecto antagónico que tengan AtGASA6 y AtHXK1 en presencia de concentraciones elevadas de Glu, sea una de las razones por las cuáles se retarda la germinación de la semilla (Price, 2003).

Durante el establecimiento de la plántula, AtHXK1 puede arrestar el desarrollo si percibe que las concentraciones de Glu en el medio de desarrollo son elevadas, esto a través de un incremento en la biosíntesis de ABA (Arenas-Huertero *et al.*, 2000). También, bajo estas condiciones de Glu, el factor de transcripción insensible a etileno-3 (EIN3, por sus siglas en inglés) promueve la germinación y el establecimiento de plántulas de A. *thaliana*; y se ha comprobado que es desestabilizado y degradado mediante un proceso post-traduccional que depende de la actividad señalizadora de AtHXK1 (Yanagisawa, Yoo & Sheen, 2003). Este es otro de los mecanismos por los cuales AtHXK1 detiene el desarrollo de las plántulas en presencia de concentraciones elevadas de Glu. El arresto del desarrollo puede interpretarse como una regresión del metabolismo de un estado en el cual debe haber mucha movilización

de reservas para establecer a la plántula a uno donde hay suficiente fuente de C que debe almacenarse para el desarrollo de la semilla (Rognoni *et al.*, 2007).

Por el contrario, bajas concentraciones de Glu promueven el establecimiento de la plántula al reprimir la expresión del factor de transcripción AtbZIP1, el cual actúa como un modulador negativo del desarrollo, a través de un mecanismo que depende de la actividad sensor de AtHXK1 (Kang *et al.*, 2010).

2. Desarrollo vegetativo y reproductivo.

Durante el desarrollo vegetativo, la HXK participa activamente promoviendo el desarrollo de la planta. Por ejemplo, la fosforilación de Glu mediada por HXK para llevarla a su completa oxidación mediante la glucólisis y fosforilación oxidativa, promueve la activación del meristemo a través de una vía de señalización dirigida por TOR (Xiong *et al.*, 2013). También se ha comprobado que durante este evento de proliferación celular ocurre una activación de la síntesis de pared celular (Xiong *et al.*, 2013) y que la actividad de HXK también es importante para producción de NDP azúcares necesarios para la biosíntesis de polisacáridos requeridos para la expansión celular (Galina & Da Silva, 2000). En maíz se encontró que melatonina a una concentración de 10 µM causa un incremento en la longitud de las hojas, la raíz y la biomasa; en la expresión de *ZmHXK4* y *ZmHXK10*, así como en la actividad total de HXK. Se propone que la melatonina promueve la glucólisis y la respiración a través de la activación de la HXK; por lo tanto se generan más energía y metabolitos necesarios para soportar el crecimiento de la planta (Zhao *et al.*, 2015).

Además, se ha encontrado que Glu en una concentración del 3% y BR provocaron un incremento en la elongación del hipocótilo, así como en la emergencia y producción de raíces laterales (LR, por sus siglas en inglés) (Mishra *et al.*, 2009; Gupta, Singh & Laxmi, 2015; Zhang & He, 2015). Gracias al uso de diferentes mutantes deficientes en las vías de señalización de HXK (*gin2-1*), BR (*bri1-6*) y de transporte e influjo de Aux (*eir1*, *aux1-7*), se ha demostrado que existe una conexión entre las vías de señalización dependientes de HXK, BR y Aux. HXK1 es el primer elemento que interviene y percibe a la Glu, río abajo actúa la proteína BR1 y mucho más adelante interviene la vía de señalización por auxinas. Se sugiere que la Glu y BR pueden alterar

distribución diferencial de auxinas para regular el crecimiento de las LR (Gupta, Singh & Laxmi, 2015).

Asimismo, existen reportes que demuestran la trascendencia de esta enzima para la reproducción, el desarrollo del fruto y el llenado de la semilla. En arroz, la proteína mitocondrial Rf6 que funciona como un gen restaurador de la fertilidad masculina, se asocia con la HXK mitocondrial OsHXK6 para reducir la acumulación del transcrito aberrante de atp6-orfH79, responsable de la esterilidad del polen. La intervención de OsHXK6 probablemente es independiente de su capacidad sensor, sin embargo su participación en la restauración de la fertilidad no es totalmente clara (Huang et al., 2015). Además, también en arroz se ha encontrado que otra HXK, OsHXK10, es importante para la germinación del polen. El gen OsHXK10 se expresa únicamente en anteras, polen y flores adultas. En líneas de plantas en las que se disminuyó la expresión de esta proteína, se reportó una disminución en el porcentaje de polen germinado y en consecuencia un incremento en el número de semillas vacías. En este estudio se propone que este fenómeno ocurre debido a una reducción en el suministro de UDP-Glu para la biosíntesis de pared celular o bien, a la falta de generación de ATP debido a la poca generación de hexosas fosfato para la glucólisis (Xu, Li & Ruan, 2008). Sin embargo, esta posibilidad parece poco probable ya que con base en la estructura primaria de esta proteína es factible que carezca de actividad catalítica (Karve et al., 2010) por lo que es viable que exista otro mecanismo por el cual OsHXK10 esté regulando el desarrollo de los órganos reproductivos, por ejemplo un mecanismo que involucre una actividad de sensor de Glu. Esta sugerencia podría ser sustentada puesto que recientemente, se encontró que en A. thaliana, bajo concentraciones elevadas de Glu, la HXK1 puede llevar a una reducción en la velocidad de crecimiento del tubo polínico, en un proceso que requiere de su actividad como sensor y no de la catalítica (Rottmann et al., 2018).

Respecto al desarrollo de los frutos y semillas, en V. vinifera se observó que la cantidad y actividad de HXK disminuyeron conforme maduraron los frutos, provocando un incremento en la acumulación de hexosas libres (Wang *et al.*, 2014). En girasol, se ha observado que en el llenado de la semilla la actividad elevada de HXK coincidió con la fase activa de la síntesis de ácidos grasos (Troncoso-Ponce *et al.*, 2009, 2011). Se propone que al encontrarse muy activa la HXK se generan grandes cantidades de G6P que pueden ser direccionadas a la vía de las pentosas fosfato y generar el NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos (Troncoso-

Ponce et al., 2011). Es probable que en maíz ocurra algo equivalente, la alimentación de la vía de las pentosas fosfato vía G6P es necesaria para el desarrollo de la semilla aunque no es la fuente más importante de NADPH (Alonso, Dale & Shachar-Hill, 2010). Además, cabe mencionar que en dos líneas de maíz que se distinguen por la cantidad de almidón que acumulan, se descubrió que esta diferencia está dada por un incremento en la expresión de varios genes, entre ellos *ZmHXK3a* y *ZmHXK3b* indicando que esto podría resultar en un aumento en la actividad de HXK y por lo tanto en la cantidad de G6P necesaria para sintetizar más almidón (Xiao et al., 2016). Sin embargo, igual que en el caso de OsHXK10, con base en la secuencia de aminoácidos es probable que estas enzimas no tengan actividad catalítica y también es factible que exista otro mecanismo que relacione a estas enzimas con la acumulación de almidón (Karve et al., 2010).

Por otro lado, en manzana (*Pyrus malus* L) la interacción de MdHXK1 con MdbHLH3 promueve la síntesis de antocianinas y por lo tanto mejora la coloración del fruto en concentraciones elevadas de Glu. MdHXK1 fosforila a MdbHLH3, la estabiliza e incrementa el efecto de este potenciador transcripcional; para lo cual únicamente se requiere la presencia del dominio 2 de MdHXK1 y el péptido de anclaje que la sitúa en la mitocondria (Hu *et al.*, 2016). Este fue el primer reporte que sugiere que la HXK además de fosforilar hexosas, también es capaz de fosforilar proteínas.

3. Senescencia y estrés.

Tanto la actividad catalítica como la de sensor de la HXK también se ha asociado con fenómenos de senescencia y estrés. La sobreexpresión de AtHXK1 en tomate aceleró la senescencia (Dai *et al.*, 1999). Dado que la acumulación de hexosas dentro de la célula la que es percibida como una señal de senescencia, en este caso por la AtHXK1, que es capaz de percibir este incremento y estimular la senescencia (Swartzberg, Hanael & Granot, 2011) aunque se desconoce de qué manera se induce.

En cuanto a situaciones de estrés, se ha comprobado que la sobreexpresión en las células guarda de AtHXK1 tanto en A. *thaliana* como en citrus *Troyer citrange*, llevó a un incremento en los niveles de *RAB18* (gen de respuesta a ABA) y *ABI5* (factor de transcripción inducido por ABA), además de disminuir la tasa de transpiración y estimular el cierre de estomas. Los autores

proponen que cuando hay baja incidencia de luz, el ATP generado por el metabolismo de Glu proporciona la energía necesaria para la apertura de los estomas, en tanto que cuando se incrementan la intensidad de la luz y la actividad fotosintética, el exceso de carbohidratos puede ser percibido por la HXK provocando el cierre de estomas. Esta respuesta puede tratarse de un mecanismo de retroalimentación negativa para reducir la transpiración y preservar el H₂O durante un exceso de la actividad fotosintética (Kelly *et al.*, 2012, 2013; Lugassi *et al.*, 2015).

Por último, en manzana, se ha observado que MdHXK1 contribuye parcialmente a la tolerancia salina a través de la fosforilación del intercambiador Na⁺/H⁺ del tonoplasto MdNHX1 (Sun *et al.*, 2018).

La variedad de ejemplos mencionados indica que la actividad dual de esta proteína afecta profundamente todo el ciclo de vida de la planta (Fig. 8).



Fig. 8. Participación de la HXK en las diferentes etapas del ciclo de vida de las plantas.

La HXK permite la germinación en condiciones de hipoxia, reduce la expresión de factores de transcripción (AtbZIP) lo que permite la reducción en el contenido de ABA y el desarrollo de la plántula. Induce la proliferación del meristemo aportando los intermediarios metabólicos para la síntesis de NDP-azúcares, además la HXK favorece junto con los BR la distribución de auxinas que promueven la elongación de los pelos radiculares. La HXK permite a plantas de manzana sobrevivir en condiciones de estrés salino. Mientras que en las hojas permite combatir a los microorganismos al inducir la expresión de genes de defensa como *PR1* y *PR5* así como el aumento en la producción de peróxido. Aunque de manera opuesta la HXK está involucrada en disminuir el potencial de la membrana mitocondrial y la producción de peróxido que lleva a reducir la respuesta a la PCD. Durante el día el exceso de carbono es percibido por la HXK en las hojas, lo que lleva a la reducción de la expresión de genes fotosintéticos y al cierre de estomas. En la etapa madura de la planta, la HXK participa en la germinación del polen, mientras que impacta en la la acumulación de hexosas, la síntesis de almidón, ácidos grasos y la síntesis de antocianinas durante la formación del fruto. Al final del ciclo de vida de la planta la HXK puede participar en promover la senescencia.

Las HXKs de plantas pertenecen a una familia multigénica; sin embargo, pocos miembros han sido caracterizados. La familia mejor estudiada, hasta ahora, es la de A. *thaliana*, la cual se compone de seis genes, tres de los cuáles codifican para proteínas que sí tienen actividad catalítica de HXK (*AtHXK1-3*) y tres que codifican para proteínas estructuralmente muy parecidas a HXK pero que carecen de actividad catalítica (*AtHKL1-3*)(Karve *et al.*, 2008). La investigación acerca de estas proteínas en otras plantas se ha enfocado principalmente en su actividad como sensor o bien, su localización celular y se conoce poco acerca de las características cinéticas. La Tabla 1 presenta un resumen de la información generada en los últimos años de las diferentes familias de HXKs de plantas.

	Familia de	Localización	Propiedades	Implicadas en	
Especie	Genes	celular	bioquímicas	la señalización	Referencias
			•	por azúcares	
A. thaliana	AtHXK1,	Tipo A: AtHXK3	AtHXK1: Km Glu 89	AtHXK1,	(Dai et al.,
	AtHXK2,	Tipo B: AtHXK1,	μΜ, <i>K</i> _m Fru 17 mM,	A†HXK3,	1999; Moore
	AtHXK3,	AtHXK2, AtHKL1,	<i>K</i> _m ATP 9.4 μM.	A†HKL1.	et al., 2003;
	AtHKL1,	AtHKL2, AtHKL3	AtHXK3: K _{m app} Glu		Yanaaisawa
	AtHKL2,	Otra: AtHXK1 en	61 µM, K _{m app} Man		
	AtHKL3.	núcleo.	85 µM, K _{m app} Fru		
			17 mM.		Sheen, 2003;
			AtHKL1, AtHKL2,		Cho, Yoo &
			AtHKL3: Carecen		Sheen, 2006;
			de actividad.		Zhang et al.,
					2010; Karve,
					Xia & Moore,
					2012; Feng
					et al.,
					2015b).
N.tabacum	NtHXK1,	Tipo A: NtHXK2	NtHXK2: Km Glu 53	NtHXK1, es	(Giese et al.,
	NtHXK1a,	Tipo B: NtHXK1,	µM, K _m Man 96	capaz de	2005; Karve
	N†HXK2,	NtHXK1a*,	μΜ, <i>K</i> _m Km Fru 14	complementar	et al., 2010;
	N†HXK3,	N†HXK3*,	mM.	gin2-1 pero en	King of al
	NtHXK4a,	NtHXK4a*,	NtHXKL1 carece	tabaco no se	kim er al.,
	NtHXK4b,	NtHXK4b*,	de actividad*.	ha demostrado	2013)
	NtHXK5,	NtHXK5*,			

Tabla 1. Nombre y número de genes, localización celular, propiedades bioquímicas y como sensor de Glu de diferentes HXKs de plantas.

	NtHXK7,	N†HXK6*,	-	su función	-
	NtHKL1	NtHXK7*, NtHKL1*.		sensor.	
O. sativa	OsHXK1,	Tipo A: OsHXK4	OsHXK5: K _m Glu	OsHXK5,	(Cho et al.,
	OsHXK2,	Tipo B: OsHXK1,	190 µM	OsHXK6,	2006, 2009;
	OsHXK3,	OsHXK2, OsHXK3,	OsHXK6: Km Glu	OsHXK7:	Aki &
	OsHXK4,	OsHXK5, OsHXK6,	200 µM	complementan	Yanaaisawa
	OsHXK5,	OsHXK9,	OsHXK3 y	gin2-1 y tienen	$2009 \cdot Kane$
	OsHXK6,	OsHXK10.	OsHXK10 carecen	un efecto sobre	
	OsHXK7,	Tipo C: OsHXK7,	de actividad*.	el desarrollo de	er ui., 2010,
	OsHXK8,	OsHXK8		la planta de	Cheng et
	OsHXK9,	Otra: OsHXK5, +6		arroz.	al., 2011;
	OsHXK10.	OsHXK6 en			Kano et al.,
		núcleo.			2013; Kim et
					al., 2016)
P. patens	РрНХК1,	Tipo A: PpHXK1,	PpHXK1 no es	No	(Olsson,
	РрНХК2,	РрНХК5, РрНХК6	capaz de	caracterizadas.	Thelander &
	РрНХКЗ,	Tipo B: PpHXK2,	complementar la		Ronne, 2003;
	РрНХК4,	РрНХКЗ, РрНХК7,	deficiencia de		Nilsson et
	РрНХК5,	РрНХК8	HXK en levaduras,		al 2011)
	РрНХК6,	Tipo C: PpHXK4	pero en musgo		GI., 2011)
	РрНХК7,	Tipo D: PpHXK9,	representa el 80%		
	РрНХК8,	РрНХК10,	de la actividad		
	РрНХК9,	PpHXK11	total de HXK.		
	PpHXK10,	Otra: PpHXK4 en			
	PpHXK11	núcleo.			
S. lycopersicum	SIHXK1,	Tipo A: SIHXK4	SIHXK3: Km Glu 24	No	(Damari-
	SIHXK2,	Tipo B: SIHXK1,	μΜ, K _m Fru 3.2 mM	caracterizadas.	Weissler et
	SIHXK3, SIHXK4	SIHXK2, SIHXK3	SIHXK4: Km Gu 38		al., 2006;
			μΜ, K _m Fru 2.3 mM		Kandel-Kfir
					et al., 2006)
S. tuberosum	StHXK1	No	StHXK1: Km Glu 33	STHXK1 STHXK2	(Veramendi
	StHXK2	caracterizadas.	uM. K _m Man 29	complementan	et al 1000
	0111112	solo se ha	uM. K _m Fru 1.5 mM.	ain2-1 pero en	er ui., 1777,
		sugerido que			2002)
		están ancladas a		no tener	
		membranas		función sensor	

V. vinifera	VvHXK1,	Tipo A: VvHXK3*	VvHXK1: Km Glu 32	No	(Karve et
	VvHXK2,	Tipo B: VvHXK1*,	µM, K _m Man 60	caracterizadas.	al., 2010: Yu
	VvHXK3,	V∨HXK2*,	μΜ, <i>K</i> _m Fru 119		
	V∨HKL1,	VvHKL1*, VvHKL2*	mM.		er al., 2013)
	VvHKL2		VvHXK2: Km Glu 40		
			µM, K _m Man 86		
			μΜ, K _m Fru 26 mM.		
			VvHKL1* y VvHKL2		
			carecen de		
			actividad.		
Z. mays	ZmHXK3a,	Tipo B: ZmHXK3a*,	Fracción soluble:	No	(Galina et
	ZmHXK3b,	ZmHXK3b*,	Km Glu 49 µM, Km	caracterizadas.	al., 1995:
	ZmHXK4,	ZmHXK4*,	ATP 167 µM.		Karria at al
	ZmHXK5,	ZmHXK5*,	Fracción		
	ZmHXK6,	ZmHXK6*,	submitocondrial:		2010; Zhang
	ZmHXK7,	ZmHXK9*,	K _m Glu 129 μΜ, K _m		et al., 2014)
	ZmHXK8,	ZmHXK10*.	ATP 156 µM		
	ZmHXK9,	Tipo C: ZmHXK7*,	ZmHXK3a*,		
	ZmHXK10	ZmHXK8*.	ZmHXK3b* y		
			ZmHXK10*		
			carecen de		
			actividad.		

Tomado de Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017. **Predicción* in silico, se carece de evidencia experimental. El estudio de las HXKs en otras especies de importancia agrícola, como maíz, resulta especialmente importante puesto que la manipulación de dichas proteínas impactaría directamente la productividad de la planta.

La familia de HXKs en maíz se compone de nueve genes (Zhang *et al.*, 2014) sobre los cuáles solo se han hecho inferencias con base en el análisis de las secuencias, es decir, que no existe evidencia experimental. Por ejemplo, se ha sugerido que ZmHXK4-6 son proteínas que podrían actuar como sensores de Glu por el elevado porcentaje de similitud que tienen con las proteínas de arroz OsHXK5 y OsHXK6 y que probablemente, son de localización mitocondrial (Karve *et al.*, 2010). Sin embargo, tampoco puede descartarse que las HXKs de localización citosólica pudiesen presentar alguna propiedad de señalización, puesto que se ha reportado que las HXKs citosólicas de *Selaginella moellendorffi* (licofita), *Synechocystis* sp. (Cianobacteria) y la HXK7 de *O. sativa* son capaces de complementar la función como sensor de la HXK1 de A. *thaliana* (Ryu *et al.*, 2008; Karve *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016). Ninguna de las presuntas isoformas

de maíz antes mencionadas ha sido caracterizada individualmente pero sí se ha determinado la actividad total e inhibición tanto en la fracción citosólica como en la fracción mitocondrial en donde posiblemente varias HXK se encuentran presentes (Galina *et al.*, 1995; Rezende *et al.*, 2006; Claeyssen & Rivoal, 2007).

Además, una gran cantidad de estudios que se enfocaron en describir la función sensor de la HXK se llevaron a cabo en un sistema de protoplastos de maíz (Sheen, 1990; Jang & Sheen, 1994; Yanagisawa, Yoo & Sheen, 2003), lo que sugiere que los mecanismos involucrados en las vías de señalización dependientes de HXK están presentes en esta monocotiledónea.

En nuestro laboratorio, se ha encontrado a través de geles de actividad (Fig. 9), que el embrión de maíz es el tejido que presenta el mayor número de isoformas (Fig.9A, Estrada-Antolín, 2011) y que existe una isoforma citosólica que incrementa su actividad durante el proceso de germinación (Fig. 9B, Aguilera-Alvarado, 2013).



Fig. 9. Perfil de isoformas de HXK en maíz.

Actividad de HXK determinada en gel de poliacrilamida nativo al 12% en A) Diferentes tejidos y B) durante el proceso de germinación. R: Raíz; T: Tallo; H: Hoja; E: Espiga; EM: Embrión maduro embebido durante 24h en agar al 1%. Fig. 9A tomada de Estrada-Antolín 2011 y Fig. 9B tomada de Aguilera-Alvarado, 2013.

Con base en todo lo anterior, se resalta la importancia de estudiar a las HXKs de maíz, analizar sus propiedades bioquímicas y de localización subcelular, así como de identificar si alguna isoforma está involucrada en la vía de señalización de carbohidratos, participando como proteína señalizadora.

III. HIPÓTESIS.

En algunas especies vegetales se han identificado HXKs que además de poseer actividad catalítica, son sensores de Glc. Dado que en maíz existe una gran variedad de isoformas de HXKs, es probable que alguna de ellas también tenga esa función dual.

IV. OBJETIVOS.

A. Objetivo general.

Caracterizar e identificar a las HXKs de maíz que tienen una función dual.

1. Objetivos particulares.

• Determinar por análisis *in silico* las HXKs de maíz que son homólogas a las HXKs sensores AtHXK1, AtHXK2, OsHXK5, OsHXK6 y a las HXKs citosólicas de arroz OsHXK7 y OsHXK8.

- Clonación de los cDNAs de las HXKs de maíz obtenidas del análisis in silico.
- Expresión y caracterización cinética de las HXK de maíz clonadas.
- Determinar la localización subcelular de las HXKs mediante la expresión de las HXKs unidas a GFP en protoplastos de A. *thaliana*.
- Identificar a la HXK sensor de maíz:
 - a) Determinar la capacidad señalizadora de las HXKs de maíz mediante ensayos de complementación en mutantes de A. *thaliana gin2-1* y la evaluación del fenotipo de las plantas en presencia de concentraciones elevadas de Glu.
 - b) Determinar de la represión del gen CAB2 en concentraciones elevadas de Glu.

MATERIALES Y MÉTODOS

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

A. Material vegetal.

Se obtuvieron embriones de maíz (raza Chalqueño) mediante extracción manual. Los embriones se desinfectaron con una solución al 0.12% de NaClO comercial y posteriormente se embebieron en agar al 1 % durante 0, 8, 12, 18, 24, 36 y 48 h h a 29°C, en oscuridad. A partir de este tejido, se llevó a cabo la extracción de RNA y obtención de cDNA para obtener los perfiles de expresión durante la germinación y el cDNA de los embriones de 24 h para la clonación de seis isoformas de HXK.

Por otro lado, se sembraron semillas de A. *thaliana* en macetas con Sunshine 3 (Sun Gro® Horticulture) y después de 48 h de incubación a 4°C, se traspasaron a una cámara de crecimiento (120-150 µmol/m²seg, 20-22 °C) donde se mantuvieron de tres a cuatro semanas o bien, hasta la obtención de semillas. Para la obtención de protoplastos se utilizaron plantas silvestres (WT) de A. *thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) mientras que, para los ensayos de complementación, se utilizó la línea mutante de A. *thaliana gin2-1* ecotipo Landsberg erecta (Ler). Todas las líneas de A. *thaliana* se obtuvieron del Arabidopsis Biological Resource Center, Universidad de Ohio, E.U.A.

B. Análisis in silico de las secuencias de las HXKs de maíz y predicción de la localización celular.

Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de las HXKs de maíz, A. *thaliana* y arroz se obtuvieron de las bases de datos EnsemblPlants y NCBI (<u>http://plants.ensembl.org/index.html</u>, <u>http://plants.ensembl.org/index.html</u>, Anexo 1). El análisis de similitud de secuencias entre las diferentes HXKs de maíz (ZmHXK3a-10) se llevó a cabo con el software Clustal Omega (<u>http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</u>). Para llevar a cabo la búsqueda por inspección de los aminoácidos y dominios conservados, se utilizó el software SeaView 4 (Gouy *et al.*, 2010) tomando como referencia los sitios presentes en AtHXK1 (Karve *et al.*, 2008). Finalmente, para la predicción de la localización subcelular de las diferentes HXKs de maíz, se utilizaron los softwares TargetP 1.1 y Toppred 1.10 (<u>http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</u>; <u>http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred</u>).

C. Clonación y construcción de plásmidos.

Para la clonación de las HXKs de maíz y de AtHXK1, se diseñaron cebadores específicos para las regiones 5' y 3' UTR de cada gen (Tabla 2), utilizando el software Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi). Posteriormente, utilizando como templado cDNA de embriones de maíz embebidos durante 24 h en agar al 1% o plántulas silvestres de A. *thaliana* Col-0 de siete días, se llevó a cabo la PCR empleando la polimerasa Advantage HD (Clontech). Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 0.7%, se purificaron y se ligaron en el vector pGEM®-T Easy (Promega) con la ligasa de DNA T4 (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los productos de la reacción de ligación se utilizaron para transformar células Ca²⁺ competentes de *E. coli* DH5a y los vectores recombinantes obtenidos (pGEM-HXK) se enviaron a secuenciar.

Tabla 2. Lista de cebadores ofilizados para la cionación	Tabla	2.	Lista	de	cebadores	utilizados	para	la	clonació
--	-------	----	-------	----	-----------	------------	------	----	----------

Nombre	Secuencia 5' → 3'
A†HXK1-UTR-FW	ATGGGTAAAGTAGCTGTTGGAG
A†HXK1-UTR-RV	TTAAGAGTCTTCAAGGTAGAGAGAGTG
ZmHXK4-UTR-FW	GGAGGGAGATTGGTTCGT
ZmHXK4-UTR-R∨	CGGATAGCCACIDOCAAGGA
ZmHXK5-UTR-FW	TAGTTCGCTGGAGGAGTTGG
ZmHXK5-UTR-R∨	TCGATCCACACCAGTTTTCA
ZmHXK6-UTR-FW	AGCTGGTGCGTACTTGGTTT
ZmHXK6-UTR-R∨	GGATGGACGGCTTATTCA
ZmHXK7-UTR-FW	GTCGCAGCTTTCTTTCGTGT
ZmHXK7-UTR-R∨	AGGATTCAGCACGAGTTGC
ZmHXK8-UTR-FW	GCCAGGACTCTTGATTTGCT
ZmHXK8-UTR-R∨	CTGCAGACGCTGGACAGTTA
ZmHXK9-UTR-FW	ACTCCCGTGGCAGTGATAC
ZmHXK9-UTR-R∨	CGTCGGATACACAGAGG

Más adelante, mediante la tecnología Gateway® se llevó a cabo la subclonación de cada una de las HXKs de maíz y de AtHXK1 en los vectores donador y destino. Para cada HXK se clonó la región codificante sin codón de paro y flanqueada por las secuencias *attB/attP*, la amplificación fue en dos rondas de PCR empleando los cebadores indicados en la Tabla 3, la polimerasa Advantage HD (Clontech) y como templado, las construcciones pGEM-HXK. A continuación, los productos de PCR fueron subclonados en el vector pDONR[™]221 (Thermo Fisher Scientific) con la enzima BP clonasa (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las clonas de entrada obtenidas se enviaron a secuenciar con el objetivo de verificar la identidad y dirección del inserto. Para el caso de las HXKs ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9, se generaron además otras cuatro clonas de entrada en el vector pDONR[™]221 (Thermo Fisher Scientific) sin los 87 nucleótidos posteriores al codón de inicio y sin el codón de paro (versiones truncas Δ30) usando los cebadores indicados en la Tabla 3. La deleción y correcta orientación del marco de lectura se confirmaron mediante secuenciación.

Nombre	
AtHXK1-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGGTAAAGTAGCTGTTGGAG
AtHXK1-GW-R∨	AGAAAGCTGGGTGAGAGTCTTCAAGGTAGAGAGAGTG
ZmHXK4-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGTGAAGGCCGTGGTGGT
ZmHXK4-GW-R∨	<u>AGAAAGCTGGGTG</u> GTCACTCGCGCCATACTGATACTG
ZmHXK5-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGGGAAGTCCGTGGTGGT
ZmHXK5-GW-R∨	AGAAAGCTGGGTGGTCACTCTCGCCATACTGGGAGT
ZmHXK6-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGCGAAGGGCGGTGCGGT
ZmHXK6-GW-R∨	AGAAAGCTGGGTGTGCAGCTTCAGCATACTGGGAGTGC
ZmHXK7-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGTGGCGGCGGCGGAC
ZmHXK7-GW-R∨	AGAAAGCTGGGTGGTACTGCGAGTGGGCAGCTGCAA
ZmHXK8-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGCGGCAGCTGCGCTGG
ZmHXK8-GW-R∨	<u>AGAAAGCTGGGTG</u> CTGAGATTGCGAGGCAGCAATCAGGG
ZmHXK9-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCGGAAGCCGGCGGCACT
ZmHXK9-GW-R∨	AGAAAGCTGGGTGATCATCCACGGCCTGGAGACGTTG
ZmHXK4∆30-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGACGCCGACCTCCTGGGG
ZmHXK5∆30-GW-Fw	<u>AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATG</u> GACGCCGCGCTCCTGGG
ZmHXK6∆30-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGAGGAGGAGTCGGCGGCGG
ZmHXK9∆30-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGCGAGGCGATGGGCACGC

Tabla 3	3. Lista de	cebadores	utilizados	pai	a la	subclonación.
			•		- 1 \	<u>a</u> 1

Las bases necesarias para la recombinación y que no están presentes en el templado original, se encuentran subrayadas.

D. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes.

Todas las clonas de entrada de las HXKs de maíz, se subclonaron mediante la tecnología Gateway® en el vector destino pET-DEST™42 (Thermo Fisher Scientific) con la enzima LR clonasa (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este vector permite la expresión de las proteínas de interés fusionadas a una cola de seis His y al epítope V5 por el extremo Cterminal.

Las clonas de expresión generadas se utilizaron para transformar la cepa BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL (Stratagene). Para la inducción de las proteínas recombinantes, se inocularon 10 µL de cada una de las clonas en 100 mL de medio LB + Ampicilina 100 µg/mL + Cloranfenicol 34 µg/mL y se incubaron por 16 h a 37°C con agitación constante (200 rpm). Posteriormente, este cultivo saturado se añadió a 1 L de medio LB y se incubó a 37°C con agitación constante (150 rpm) hasta que alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 0.600 a 600 nm. Una vez alcanzada la

MATERIALES Y MÉTODOS

D.O. deseada, se añadió IPTG a una concentración final de 0.75 mM y se incubó a 25°C con agitación constante (150 rpm) durante 2 h para ZmHXK7 y ZmHXK8; 4 h para ZmHXK4∆30, ZmHXK5Δ30, ZmHXK9Δ30 y 6 h para ZmHXK6Δ30. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 3500 xg durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 30 mL de amortiguador de lisis (NaCl 500 mM, NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 50 mM pH= 8.0 y Benzamidina 5 mM) y se incubó en hielo durante 10 min. La suspensión se sonicó durante 5 min con pulsos de 30 seg e intervalos de 30 seg. Concluida la sonicación, la suspensión se centrifugó a 13 000 xg, 4°C durante 5 min y el sobrenadante se sometió a una purificación en condiciones nativas en una columna de afinidad de Ni²⁺ (05 893 682 001, Roche) equilibrada con 30 mL de del amortiguador A (NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 50 mM pH= 8.0, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM y Benzamidina 5 mM). La proteína se eluyó con 6 mL del amortiguador B (NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 50 mM pH= 8.0, NaCl 300 mM, Imidazol 50-250 mM y Benzamidina 5 mM). Posteriormente, se realizó un cambio al amortiguador C (NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 50 mM pH= 8.0 y Benzamidina 5 mM) con ayuda de un filtro tipo Amicon con un límite de corte de 30 kDa (Millipore). Por último, a las fracciones concentradas se les agregó glicerol a una concentración final de 10% y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

E. Determinación de proteína.

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976) utilizando BSA como estándar.

F. Detección de las proteínas recombinantes.

Para monitorear la inducción, solubilidad e identificación de la proteína recombinante, se prepararon geles discontinuos de poliacrilamida (Gel concentrador 4% y gel separador 12%) en condiciones desnaturalizantes. Se utilizaron 5.00 µL de cada una de las muestras y se mezclaron con 5 µL de amortiguador de carga para SDS-PAGE 5X (Tris/HCI 0.175 M, pH 6.8; SDS al 12%, DTT 0.50 M; Glicerol al 60% y Azul de Bromofenol al 0.6%). Posteriormente se añadieron 10.00 µL de H₂O desionizada, se mezcló y se calentó a 80°C durante 10 min, se incubó en hielo y la muestra se cargó en el gel. Los geles se corrieron a 15 mA, hasta que las muestras llegaron al gel separador y después se cambió el amperaje a 25 mA. El corrimiento se realizó a
temperatura ambiente, durante 45 min aproximadamente. Al finalizar, el gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie (Azul del Coomassie R-250 al 0.125%; CH₃OH al 50% y CH₃COOH al 10%). Cuando el gel se preparó para la inmunorréplica tipo Western (Towbin, Staehelin & Gordon, 1979), no se realizó la tinción del mismo con azul de Coomassie y se procedió a realizar la transferencia a una membrana de nitrocelulosa.

Para la inmunorréplica tipo Western (Towbin, Staehelin & Gordon, 1979), se realizó una transferencia húmeda a una membrana de nitrocelulosa de las proteínas del SDS-PAGE. Posteriormente la membrana se tiñó con una solución de Rojo de Ponceau y se lavó con H₂O destilada, para confirmar que las proteínas se transfirieron a la membrana. La membrana se bloqueó durante 1 h con solución bloqueadora (Tris-HCl 20 mM, pH= 7.50; NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.1% y leche descremada al 5%), se realizaron tres lavados con amortiguador TTBS (Tris-HCl 20 mM, pH= 7.50; NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.1%), se incubó con el Ac monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano, generado en ratón Anti-V5-HRP (R961-25, Invitrogen) en una dilución 1:5000. Este anticuerpo reconoce al epítope V5 localizado en el extremo C terminal de cada una de las proteínas recombinantes. Se realizó una incubación durante 1 h 30 min a 30°C. Más adelante, la membrana se lavó cinco veces 5 min por vez con amortiguador TTBS y se procedió al revelado con 2 mL de una solución de H₂O₂ - Luminol (1:1, WBKLS0500, Merck-Millipore). Se incubó la reacción durante 1 min y la membrana se expuso en el fotodocumentador ChemiDocTMMP (Bio-Rad).

G. Ensayo de actividad de HXK in vitro.

Se siguió el procedimiento reportado por Dai (1999) con algunas modificaciones. Brevemente, el ensayo se realizó en una placa de 96 pozos para determinar la actividad de HXK con Glu o Fru como sustratos. El medio de reacción contenía NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 50 mM pH= 8.0, MgCl₂ 2 mM, EDTA 1 mM, KCl 15 mM, ATP 2 mM, PEP 2 mM, G6PDH 1 U/mL, PK 7 U/mL y NADP⁺ 4 mM. Cuando se utilizó Fru como sustrato se añadió a esta mezcla PGI 3 U/mL. Para la actividad de HXK teniendo como sustrato Man o como inhibidor G6P la reacción se llevó a cabo en un medio de reacción que contenía NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ 50 mM pH= 8.0, MgCl₂ 2 mM, EDTA 1 mM, KCl 15 mM, ATP 2 mM, PEP 2 mM, PK 7 U/mL, LDH 10 U/mL y NADH 2.5 mM. Para la actividad de HXK en presencia de NAG o ADP, la reacción se llevó a cabo en presencia de Glu 5mM o 50 mM como sustrato en el primer medio de reacción descrito en este apartado. La reacción inició con la adición de 2.5 µg de proteína y se registró el cambio de absorbencia a 340 nm cada 15 seg durante 5 min en el espectrofotómetro EpochTM (Bio Tek), con ayuda del software Gen5TM Microplate Data Analysis. Finalmente, los valores de K_m , V_{max} y CI_{50} para cada uno de los sustratos e inhibidores utilizados se obtuvieron con el software OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation).

H. Ensayo de complementación en Saccharomyces cerevisiae.

Cada una de las clonas de entrada obtenidas de las versiones completas y truncas de las diferentes HXKs de maíz y AtHXK1 se subclonaron mediante la tecnología Gateway® en el vector pDRf1 (donación de Wolf Frommer & Dominique Loque, plásmido de Addgene # 36026) con la enzima LR clonasa (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este plásmido, la expresión del cDNA está bajo el control del promotor de la ATPasa de membrana plasmática de S. cerevisiae y las proteínas codificadas se expresan de forma nativa.

Se utilizó la cepa de S. cerevisiae JT 20088, fondo genético W303-1a (hxk1::HIS3 hxk2::LEU2 glk1::LEU2) y la transformación se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por Gietz (2014). Brevemente, la cepa mutante se sembró en medio YPG sólido y se incubó durante tres días a 30°C. A partir de este cultivo, se tomó una alícuota para inocular 3 mL de medio YPG líquido. Se incubó durante 16 h a 200 rpm, se determinó el título del cultivo midiendo la D.O. a 600 nm sabiendo que una suspensión de 1x10⁶ células/mL da una D.O.600 de 0.1. Se tomaron 2.5x10⁸ células y se inocularon en 50 mL de medio YPG líquido; se incubó a 30°C, 200 rpm hasta alcanzar un título de por lo menos 2x107 células/ mL (aproximadamente 4 h). Posteriormente, las células se centrifugaron a 4 000 xg durante 5 min a 4°C, se lavaron con 25 mL de H₂O estéril y se resuspendieron en 1 mL de H₂O estéril. Dicha suspensión se transfirió a un tubo de microfuga de 1.5 mL, se centrifugó a 13 000 xg durante 30 seg, se descartó el SN y se resuspendió en 1 mL de H₂O estéril. Se colocaron 100 µL de dicha suspensión (1x10⁸ células) en tubos de microfuga de 1.5 mL y a cada tubo se le adicionaron 360 µL de "T-mix" (Tabla 4). Se resuspendió vigorosamente con ayuda del vórtex y se incubó durante 45 min a 42°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 13 000 xg durante 30 seg, se descartó el SN y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de H₂0 estéril. Finalmente, se sembraron 100 µL de la suspensión en el medio sólido suplementado con galactosa (SGal-URA) y se incubó durante 4 días a 30°C.

Posteriormente, se seleccionaron las transformantes y se sembraron en medio líquido SGal-URA durante toda la noche. Al día siguiente, se tomaron 250 µL de cada uno de estos cultivos y se adicionaron a 1 mL de medio fresco SGal-URA hasta alcanzar una D.O. de 0.5 a 600 nm. A partir de este cultivo se sembraron 10 µL de las diluciones 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴ en tres medios SGal-URA, Glu (SD-URA) y Fru (SFru-URA) y se incubaron a 30°C durante 2 días.

Tabla 4. Mezcla de transformación "T-mix".

Componente	Volumen (µL)
PEG 3500 (50%, p/v)	240
CH3COOLi 1.0 M	36
DNA acarreador de cadena sencilla (2.0 mg/mL)*	50
DNA plasmídico + H ₂ O estéril	34
Volumen final	360

*Desnaturalizar durante 5 min a ebullición y colocar inmediatamente en un baño de hielo durante 5 min. Mezclar con vórtex antes de tomar con la micropipeta

I. Localización subcelular de las proteínas de fusión ZmHXK:GFP en protoplastos de A. thaliana.

Todas las clonas de entrada (versiones completas y truncas de las diferentes HXKs de maíz y AtHXK1) se digirieron con la enzima *Mlul* (FD0564, Thermo Scientific) y los fragmentos de aproximadamente 3000 pb se subclonaron mediante la tecnología Gateway® en el vector pEarleyGate 103 (Earley *et al.*, 2006) con la enzima LR clonasa (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En este plásmido, la expresión del cDNA está bajo el control del promotor 35S y las proteínas codificadas están fusionadas a la proteína GFP por el extremo C-terminal.

Para el monitoreo de la expresión de las proteínas de fusión, se aislaron y transformaron protoplastos de plantas de A. *thaliana* ecotipo Col-0 de 3-4 semanas de edad de acuerdo con el protocolo reportado por Yoo (2007). Brevemente, se obtuvieron las terceras y cuartas hojas de la roseta, se cortaron en tiras de aproximadamente 0.5-1.0 mm con ayuda de una navaja e inmediatamente se colocaron en una caja Petri que contenía una solución de enzimas (Tabla 5). Las tiras se sumergieron completamente por ambos lados en la solución de enzimas. La caja se incubó al vacío con ayuda de un desecador durante 30 min en oscuridad. Posteriormente, se incubó a 25°C durante 1h 30 min con agitación constante de 40 rpm en oscuridad y finalmente, durante 5 min a 80 rpm. Se agregó un volumen de la solución de lavado W5 (Tabla 5) y se filtró la solución de enzimas y protoplastos con un filtro de Nylon de 75 µm. El filtrado se

centrifugó a 200 xg durante 2 min, se descartó el SN y el botón se resuspendió agitando suavemente. Con ayuda del microscopio óptico Olympus CH30, se verificó la integridad de los protoplastos y se realizó su conteo en un hematocitómetro. Los protoplastos se resuspendieron en el volumen necesario de la solución W5 para tener una concentración final de 2x10⁵ células/mL y se incubaron a 4°C durante 30 min. Posteriormente se resuspendieron en el volumen necesario de la solución MMg (Tabla 5).

Tabla 5. Soluciones	utilizadas	para la	preparación	de p	protop	olastos.	
							_

Solución de enzimas	Solución de lavado W5	Solución MMg	Solución PEG
MES 20 mM, pH= 5.7 Celulasa R-10 1.5% (p/v) Macerozima R-10 0.4% (p/v) Manitol 0.4 mM KCl 20 mM CaCl ₂ 10 mM*	MES 2 mM, pH= 5.7 NaCl 154 mM CaCl ² 125 mM KCl 5 mM	Manitol 0.4M MgCl2 15mM MES 4mM pH=5.7	PEG 4000 40% Manitol 0.2 M CaCl ₂ 100 mM

*La solución se calentó a 55°C durante 10, se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó el CaCl₂. Finalmente, la solución se filtró con un filtro de 0.45 μM y se colocó en una caja Petri.

Para llevar a cabo la transformación, en un tubo de microfuga de 2 mL de fondo redondo se adicionaron: 10 µg de DNA (sin exceder 10 µL de volumen), 100 µL de protoplastos y 110 µL de la solución PEG (Tabla 5), se incubó durante 30 min a 25°C en la oscuridad y se agregaron 440 µL de la solución W5. La mezcla se centrifugó durante 2 min, el SN se descartó y el botón se resuspendió en 100 µL de la solución W5 y se incubaron de 16-20 h, 25°C en oscuridad en una placa de 24 pozos. Transcurrido este tiempo de incubación, los protoplastos se tiñeron con el colorante Mitotracker® RED CMXRos (Molecular Probes, Eugene, OR) a una concentración de 75 ηM durante 5 min en oscuridad. Posterior a la incubación, los protoplastos se lavaron y se observaron en el microscopio confocal Olympus BX51. La fluorescencia de GFP fue analizada a las longitudes de onda de 488 nm/ 505-545 nm (excitación/ emisión) y la del Mitotracker a 581 nm/ 644 nm (excitación/ emisión).

J. Ensayo de complementación en A. thaliana (mutantes gin2-1, Moore et al., 2003).

Las clonas de entrada de las versiones completas de las diferentes HXKs de maíz se digirieron con la enzima *Mlul* (FD0564, Thermo Scientific) y los fragmentos de aproximadamente 3000 pb se subclonaron mediante la tecnología Gateway® en el vector pGWB14 (Nakagawa *et al.*, 2007) con la enzima LR clonasa (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este plásmido, la expresión del cDNA está bajo el control del promotor 35S y las proteínas codificadas están fusionadas con tres péptidos de hemaglutinina (HA) por el extremo C-terminal. Estas construcciones se utilizaron para transformar la cepa de Agrobacterium tumefaciens GV3101.

Para el ensayo de complementación de las mutantes de A. thaliana gin 2-1, se siguió el protocolo de transformación reportado por Clough y Bent (1998). Se utilizaron plantas de aproximadamente cuatro semanas de edad, a las cuales se les cortó la inflorescencia principal tres días antes de la transformación. A la par, se prepararon los cultivos de A. tumefaciens inoculando una asada de cada una de las cepas de interés en 5 mL de medio LB líquido suplementado con Rifampicina 75 µg/ mL, Kanamicina 50 µg/ mL, Higromicina 15 µg/ mL y se incubó durante 18 h a 30°C, 220 rpm. Se tomaron 2 mL de este medio saturado y se agregaron a 250 mL de medio LB líquido suplementado con Rifampicina 75 µg/mL, Kanamicina 50 µg/mL, Higromicina 15 µg/mL y se incubó durante 18 h a 30°C, 220 rpm. Después, los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min a 4°C y los botones se resuspendieron en 100 mL de una solución de Sacarosa al 5% y Silweet L-77 al 0.05%. Se cortaron las yemas florales y las flores de cada una de las plantas y los tallos se sumergieron durante 1 min en la solución de A. tumefaciens, Sacarosa al 5% y Silweet L-77 al 0.05% teniendo cuidado de no sumergir la roseta. Posteriormente, las plantas se colocaron de manera horizontal en una charola cubierta con papel absorbente y se cubrieron con un domo transparente para conservar la humedad. Después de tres días, se retiró el domo y se dejaron crecer las plantas a 22°C hasta la obtención de semillas.

A partir de las semillas obtenidas, se llevó a cabo la selección de las plántulas transgénicas en medio Gamborg's B-5 (G5893, SIGMA) y las plantas se autofecundaron hasta la obtención de homocigotas (generación T4). Para el ensayo de sensibilidad a Glu, las semillas de las plantas homocigotas se sembraron en agar suplementado con Glu o Manitol al 2% (p/v) y se incubaron durante cinco días a 22°C con luz continua.

K. Análisis estadístico.

Se realizó un ANOVA de una vía para determinar la sensibilidad a Glu en las poblaciones de plantas de las diferentes líneas transgénicas, para lo cual se contabilizaron las plantas que fueron capaces de establecerse en Glu al 2%. Se realizaron dos réplicas independientes con al menos 50 plantas de cada línea y los datos obtenidos se analizaron con el software OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation).

L. RT-PCR.

La extracción de RNA de levaduras, plántulas de A. *thaliana* y embriones de maíz embebidos durante 0, 8, 12, 18, 24, 36 y 48 h se llevó a cabo mediante el método del Trizol (Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad y pureza del RNA obtenido se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, empleando como referencia la intensidad de las bandas ribosomales 18S y 28S. Para la reacción de retrotranscripción, se usó 1 µg de RNA total como templado y el Sistema de Transcripción Inversa ImProm-II™ (Promega). El cDNA obtenido se utilizó para:

- a) Detectar los niveles de mRNA de las diferentes HXKs de maíz en las clonas transformantes de la cepa de S. cerevisiae JT 20088, fondo genético W303-1a (Tabla 6, cebadores para detección) de acuerdo con las condiciones indicadas en la Tabla 7.
- b) La genotipificación de las mutantes gin 2-1 y las mutantes gin 2-1 transformadas con las diferentes HXKs de maíz (Tabla 6, cebadores para detección) de acuerdo con las condiciones indicadas en la Tabla 7.
- c) Determinar la represión del gen de la proteína de unión a clorofila a/b (CAB2) en las plántulas silvestres, mutantes y mutantes complementadas con las diferentes HXKs de maíz, utilizando como gen de referencia al de la adenina fosfotransferasa (APT1, Tabla 4, cebadores para detección) de acuerdo con las condiciones indicadas en la Tabla 5.
- d) Llevar a cabo un PCR semicuantitavo de las HXKs de maíz en embriones de maíz embebidos durante 0, 8, 12, 18, 24, 36 y 48 h (Tabla 6, Cebadores para detección) de acuerdo con las condiciones indicadas en la Tabla 7. Los amplicones generados se visualizaron en un gel de agarosa al 2.0%.

Nombre	Secuencia
AtHXK1-Fw	TGCTGCTTTCTTTGGCGATACAGT
AtHXK1-R∨	AAAATGGCGCTCTTTGGGTAGGTT
AtAPT1-Fw	TTCGGAGGAGTATTCGTTGG
AtAPT1-R∨	CGCAAGCACATTCAACAATC
AtCAB2-Fw	ATGGCCACTTCAGCAATCCAA

Tabla 6. Lista de cebadores utilizados para la detección.

A†CAB2-R∨	CACAACTTGACACGCCCATAT
ZmHXK3a-RT-Fw	TCAAGATGCTGCTCACCTTC
ZmHXK3a-RT-Rv	AAGCTCGACCTTACGGCGA
ZmHXK3b-RT-Fw	TCAAGATGCTGCTCACCTTC
ZmHXK3b-RT-Rv	AAGTTCAACCTTCCGACGG
ZmHXK4-RT-Fw	AAAACGCCGGTGCCAGTG
ZmHXK4-RT-R∨	CAACGCCAACGAACCAATTC
ZmHXK4-Fw	CACGGTTGGTGAAGATGTTG
ZmHXK4-Rv	TGACATATCTGGCGTCCTCA
ZmHXK5-RT-Fw	TTTCGGCTTCCTTTCTTGGC
ZmHXK5-RT-R∨	TATGTTCCTGCCGTCCAAAC
ZmHXK5-Fw	CACGGTTGGTGAAGATGTTG
ZmHXK5-Rv	TGACATATCTGGCGTCCTCA
ZmHXK6-RT-Fw	GGGACTCTAATTAAGTGGACCAAAG
ZmHXK6-RT-R∨	AGCCAATGTGCCTACAGTATC
ZmHXK7-RT-Fw	GCTGTTGGTGAGGATGTCG
ZmHXK7-RT-R∨	CGTCCTCATCGTTGTACCG
ZmHXK8-RT-Fw	TCTCCTACGTCGATAAGCTCC
ZmHXK8-RT-R∨	GAATGCCGACTTCTCTGGAG
ZmHXK9-RT-Fw	GAAATTGTCCGAAGGGTCTTG
ZmHXK9-RT-R∨	TCAGGCGATGTGTCTTGATG
ZmHXK10-RT-Fw	TTGCTTATCCACCCCTTTCG
ZmHXK10-RT-R∨	GTCTCCGAGTCTTCATTGGAAC

Tabla 7. Condiciones de PCR para la detección de las HXKs de maíz.

Pre-desnaturalización	Amplificación*	Extensión final
	98°C, 30 seg	
94°C, 3 min	60°C, 1 min	72°C, 10 min
	72°C, 1 min	

*El número de ciclos de amplificación fue de 23 para AtATP1, AtCAB2; 28 para ZmHXK7-8; 30 para AtHXK1, ZmHXK3a-

6, ZmHXK9 y 35 para ZmHXK10

VI. RESULTADOS.

A. Identificación de los miembros de la familia de HXKs de maíz con actividad catalítica.

1. Análisis In silico.

Con el fin de identificar las relaciones evolutivas entre las HXKs de maíz y otras HXKs de plantas, 112 secuencias de aminoácidos de HXKs de plantas se alinearon con ayuda del software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Cabe mencionar que cada una de las secuencias se verificó que contuviera los dominios característicos de las HXKs: hexocinasa_1(PF00349) y hexocinasa_2 (PF03727) (Feng *et al.* 2015; El-Gebali *et al.* 2018). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud con base en el método JTT (Jones *et al.*, 1992). Este análisis filogenético incluyó a las dos HXKs de S. cerevisiae como grupo externo (Fig. 10 y Anexo 1).

El número de miembros en estas familias de HXKs de plantas fue variable: desde solo dos miembros para *Marchantia pollymorpha* hasta 26 para *Triticum aestivum*. Se pudieron distinguir en el árbol la formación de nueve clados. El primer grupo que se identificó (negro) incluye aquellas HXKs que carecen de actividad catalítica, pues con base en el análisis de la secuencia unen a la Glu con muy baja afinidad (Karve *et al.*, 2008, 2010). Dentro de este grupo se encuentran HXKs tanto de monocotiledóneas como dicotiledóneas y para el caso de las HXKs de maíz, tres proteínas fueron identificadas en este clado: ZmHXK3a, ZmHXK3b y ZmHXK10. El segundo grupo (gris) está integrado por aquellas HXKs que no tienen actividad catalítica porqué se sugiere que no pueden unir Glu (Karve *et al.*, 2010). Cabe destacar que dentro de este grupo solo se encuentran HXKs de dicotiledóneas. Los grupos tres (naranja) y cuatro (verde) están formados por HXKs de briófitas, licofitas y cloroplásticas (Cho *et al.*, 2006; Kandel-Kfir *et al.*, 2006; Karve *et al.*, 2008, 2010; Cheng *et al.*, 2011). Ninguna HXK de maíz se encontró en este grupo; además de esto, resulta interesante que las HXKs cloroplásticas parecen ser más abundantes en dicotiledóneas que en monocotiledóneas (únicamente están presentes en arroz y trigo).

Otra separación interesante ocurre entre las HXKs citosólicas (azul) y mitocondriales (grupos rosa y rojo, J.-I. Cho et al. 2006; Karve et al. 2008; Karve et al. 2010; Cheng et al. 2011; Kim et al. 2013). El grupo de las HXKs citosólicas es discreto y solamente se encuentran HXKs de plantas monocotiledóneas, en el caso de maíz, dos proteínas caen en este grupo: ZmHXK7 y ZmHXK8.

Por otro lado, el grupo más numeroso de HXKs está formado por las HXKs mitocondriales, las cuales se dividen en tres clados: el primero (rojo) incluye a aquellas proteínas de plantas

dicotiledóneas, algunas de las cuales se les ha comprobado la actividad de sensor de Glu (Moore et al., 2003; Cho et al., 2009; Cho, Sheen & Yoo, 2010; Kim et al., 2013). El segundo clado (rosa oscuro) incluye a HXKs de monocotiledóneas que probablemente poseen una función dual (catalítica y sensor) esto debido a la presencia de OsHXK5 y OsHXK6 (Cho et al., 2009). ZmHXK4, ZmHXK5 y ZmHXK6 forman parte de este clado. Finalmente, el tercer grupo de las HXKs mitocondriales (rosa claro) está fo rmado por aquellas proteínas cuya localización celular es conocida pero su actividad catalítica o sensor es desconocida (Cho et al., 2006; Cheng et al., 2011). ZmHXK9 pertenece a este grupo.



Fig. 10. Análisis filogenético de las HXKs de plantas.

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud con base en el método JTT (Jones et al., 1992) y con 2000 "bootstraps". El árbol mostrado es aquel que tuvo el valor más alto del log de verosimilitud. El árbol inicial se obtuvo aplicando los algoritmos de Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias estimadas por pares utilizando el modelo JTT. El árbol está dibujado a escala y la longitud de las ramas se midió de acuerdo al número de sustituciones por sitio. El análisis se llevó a cabo usando el software MEGA X (Kumar et al., 2018) y un total de 114 secuencias de aminoácidos fueron analizadas.

Sc: Saccharomyces cerevisiae; Mp: Marchantia polymorpha; Pp: Physcomitrella patens; Sm: Selaginella moellendorffii; Hv: Hordeum vulgare; Os: Oryza sativa ssp japonica; Sb: Sorghum bicolor; Zm: Zea mays; Ta: Triticum aestivum; At: Arabidopsis thaliana; Vv: Vitis vinifera; SI: Solanum lycopersicum; St: Solanum tuberosum; Mt: Medicago truncatula; Nt: Nicotiana tabacum.

Paralelamente, se realizó un alineamiento múltiple de las familias de HXKs de A. *thaliana*, arroz y maíz con ayuda del software SeaView 4 (Gouy, Guindon & Gascuel, 2010). Este análisis se llevó a cabo con el objetivo de asignar los dominios, regiones o aminoácidos conservados de la familia de HXKs de maíz tomando como referencia a AtHXK1 (Anexo 2, Anexo 3, Karve *et al.*, 2008). Además, se identificaron los aminoácidos involucrados en la catálisis y en contacto con los sustratos con base en la estructura cristalográfica de AtHXK1 (Anexo 2, Feng *et al.*, 2015).

De manera general se encontró que los residuos catalíticos están altamente conservados en la familia de HXKs de maíz, así como también lo están los aminoácidos que hacen contacto con Glu (Karve *et al.* 2008; Feng *et al.* 2015). En cambio, se observó mayor variación en los aminoácidos implicados en la unión con el grupo fosfato (Anexo 2) particularmente en las proteínas ZmHXK3a, ZmHXK3b y ZmHXK10, siendo esta última la que presentó el mayor número de diferencias. Respecto a los dominios, se encontró que los que contienen más modificaciones dentro de la propia familia de HXKs de maíz y con relación a las familias de A. *thaliana* y arroz, son el loop 2 y el domino de unión a adenosina (Anexo 3).

Por otro lado, se observó que ZmHXK3a, ZmHXK3b y ZmHXK10 son las proteínas que tienen las mayores diferencias en los dominios y residuos involucrados en la unión de los sustratos, particularmente ZmHXK10. Dichos cambios coinciden con los presentes en las HKL de A. *thaliana* y de arroz (Karve *et al.*, 2008, 2010). Esto aunado a los resultados encontrados en el análisis filogenético apoyó la idea de que estas tres proteínas carecen de actividad catalítica. En plantas el papel de las HKLs no es muy claro y sólo existe un reporte acerca de la función antagónica que tiene la AtHKL1 de A. *thaliana* con AtHXK1 (Karve, Xia & Moore, 2012). Lamentablemente, pese a los intentos por clonarlas para determinar su actividad, no fue posible debido al elevado grado de homología entre ellas (Anexo 1) por ello en este trabajo sólo se decidió abordar a las seis HXKs que presuntamente presentan actividad catalítica: ZmHXK4-9.

2. Caracterización bioquímica de las HXKs de maíz.

Con la finalidad de caracterizar cinéticamente a cada una de las presuntas HXKs de maíz y corroborar que se trataban de proteínas con actividad catalítica, las HXKs ZmHXK4-9 se clonaron, se expresaron en *E. coli* y se purificaron en una columna de afinidad de Ni²⁺ mediante la etiqueta de seis His que se añadió a cada proteína en el extremo C-terminal. Para el caso de las HXKs de supuesta localización citosólica, ZmHXK7 y ZmHXK8, se encontró que eran proteínas solubles (Fig. 11D y 11E); mientras que ZmHXK4-6 (Fig 11A-C), presuntamente mitocondriales, se encontraron en el botón formando cuerpos de inclusión y a pesar de su solubilización con detergente y renaturalización, no mostraron actividad de HXK. Para el caso de ZmHXK9 no se logró inducir la proteína (Fig. 11F).



Fig. 11. SDS-PAGE y Western Blot de las versiones completas de las HXKs recombinantes de maíz.

Monitoreo de la purificación de las proteínas recombinantes A) ZmHXK4, B) ZmHXK5, C) ZmHXK6, D) ZmHXK7 y E) ZmHXK8. Las fracciones se separaron en un SDS-PAGE al 12%. F) Western Blot de las versiones completas de las HXKs de maíz ZmHXK4-8 con sus versiones truncas, las cuales tienen una diferencia de tamaño de aproximadamente 3 kDa con respecto a las proteínas completas. F) Western Blot de las versiones completas de las HXKs de maíz. Las proteínas recombinantes purificadas fueron detectadas por la fusión en el extremo C-terminal del péptido V5. Las bandas se detectaron con el fotodocumentador ChemiDoc™MP (Bio-Rad). St: Marcador de peso molecular, B: Botón clarificado con urea, S: Lisado soluble, N: Fracción no unida a la resina, L: Lavados, E: Elución.

Debido a que era probable que la presencia de una secuencia altamente hidrofóbica en el extremo N-terminal estuviera provocando la agregación de las proteínas se decidió eliminar los primeros 30 aminoácidos de ZmHXK4-6 y ZmHXK9 (Anexo 4). Estas nuevas versiones se crearon utilizando como molde las clonas generadas en el vector pGEM®-T Easy, amplificando a partir del nucleótido 91 del marco de lectura abierto. Las versiones obtenidas se denominaron ZmHXK4Δ30, ZmHXK5Δ30, ZmHXK6Δ30 y ZmHXK9Δ30.

En general, se observó que luego de la eliminación de los primeros 30 aminoácidos ZmHXK4Δ30, (Fig. 12A), ZmHXK5Δ30 (Fig. 12B), ZmHXK6Δ30 (Fig. 12C) y ZmHXK9Δ30 (Fig. 12D) se encontraron en el sobrenadante, mejoró la solubilidad de las proteínas recombinantes y el rendimiento, e incluso se logró la expresión de ZmHXK9Δ30. Estas variantes truncas, cuyo peso molecular claramente fue menor respecto a las completas (Fig. 12E), junto con las versiones completas ZmHXK7 y ZmHXK8, fueron las que se utilizaron para la caracterización de la actividad de HXK (Fig. 12F).





Fig. 12. SDS-PAGE y Western Blot de las versiones truncas de las HXKs recombinantes de maíz.

Monitoreo de la purificación de las proteínas recombinantes A) ZmHXK4∆30, B) ZmHXK5∆30, C) ZmHXK6∆30 y D) ZmHXK9∆30, las fracciones se separaron en un SDS-PAGE al 12%. E) Western Blot de las versiones completas de las HXKs de maíz ZmHXK4-6 con sus versiones truncas, las cuales tienen una diferencia de tamaño de aproximadamente 3 kDa con respecto a las proteínas completas. F) Western Blot de las versiones completas y truncas de las HXKs de maíz que fueron utilizadas para los ensayos de actividad. Las proteínas recombinantes purificadas fueron detectadas por la fusión en el extremo C-terminal del péptido V5. Las bandas se detectaron con el fotodocumentador ChemiDoc™MP (Bio-Rad).St: Marcador de peso molecular, S: Lisado soluble, N: Fracción no unida a la resina, L: Lavados, E: Elución.

Al llevar a cabo los ensayos de actividad, se encontró que las proteínas ZmHXK4Δ30-8 fueron capaces de fosforilar las tres hexosas probadas: Glu (Fig. 13A-E), Fru y Man (Anexo 5), aunque con diferente afinidad y velocidad de reacción. Para el caso de ZmHXK9Δ30, se observó que fue la única proteína que mostró una actividad de HXK mínima, aún en presencia de concentraciones elevadas de cada uno de los sustratos (Fig. 13F, Anexo 5).

Por otro lado, las gráficas de actividad obtenidas revelaron que las proteínas ZmHXK4∆30-8 se ajustaron a la cinética de Michaelis-Menten cuando se utilizaron Glu (Fig 13A-E), Fru, Man y ATP como sustratos (Anexo 5). Con todos los datos numéricos obtenidos de los ensayos de actividad, se calcularon los parámetros cinéticos mediante un ajuste de regresión no lineal (Tabla 8).

En el caso de las proteínas truncas ZmHXK4 Δ 30, ZmHXK5 Δ 30 y ZmHXK6 Δ 30, se pudo observar un comportamiento muy similar entre ellas respecto a la preferencia por hexosas: el valor de K_m más pequeño lo tuvieron con Man, seguido por Glu y finalmente, la hexosa por la que presentaron menor afinidad fue la Fru (Tabla 8). En relación con el ATP, las tres proteínas truncas también presentaron mucha similitud en cuanto a la afinidad por este sustrato: todas las K_m calculadas para el ATP se encontraron en el rango μ M (Tabla 8).



Fig. 13. Curvas de saturación de la actividad de HXK con Glu como sustrato.

La actividad de HXK de las isoenzimas de maíz fue determinada con las versiones truncas o completas de A) ZmHXK4Δ30, B) ZmHXK5Δ30, C) ZmHXK6Δ30, D) ZmHXK7, E) ZmHXK8 y F) ZmHXK9Δ30. El medio de reacción contenía 2.5 µg de proteína recombinante purificada, ATP a una concentración fija (2 mM) y Glu en un rango de concentraciones de 0.01 a 100 mM. Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten. Las gráficas fueron obtenidas con el software Origin 8.0. Solamente ZmHXK9Δ30 no mostró actividad de HXK significativa. Los puntos graficados representan la media y la desviación estándar de seis réplicas independientes.

Por otro lado, para las proteínas ZmHKX7 y ZmHXK8, se encontraron diferencias importantes al comparar su comportamiento con cada uno de los sustratos utilizados. Para comenzar, a diferencia de ZmHXK4 Δ 30-6 Δ 30, la hexosa preferida por ZmHK7 y ZmHXK8 sí fue la Glu (Fig. 13D-E, Tabla 8) aunque la afinidad por la misma fue bastante diferente: la K_m de ZmHXK7 se situó en el rango μ M mientras que, la de ZmHXK8 se localizó en el rango mM (Tabla 8).

Cuando se utilizaron Man y Fru como sustrato, se encontró que ZmHXK7 fue más afín por estas hexosas mientras que, ZmHXK8 requirió de concentraciones muy elevadas de estas hexosas para mostrar actividad (Anexo 5, Tabla 8). Particularmente para el caso de Fru y ZmHXK8 no fue posible alcanzar la saturación ni obtener el valor de K_m (Anexo 5, Tabla 8).

El único caso el cual no se observaron grandes diferencias entre ZmHXK7 ZmHXK8 fue cuando el ATP se usó como sustrato; ambas enzimas fueron muy afines por él y alcanzaron velocidades de reacción elevadas (Anexo 5, Tabla 8); caso contrario al de ZmHXK4 Δ 30-6 Δ 30 que, aunque sus valores de *K*_m calculados para ATP fueron pequeños, las *V*_{max} alcanzadas fueron muy bajas (Anexo 5, Tabla 8).

Finalmente, cabe destacar de que de todas las HXKs de maíz estudiadas, ZmHXK7 fue la que presentó las velocidades de reacción más elevadas con todos los sustratos probados (Anexo 5, Tabla 8).

		Sustrato			
		Glucosa	Fructosa	Manosa	ATP
	Km	195.70 ± 31.96	19324.15 ± 3914.89	138.85 ± 22.42	134.90 ± 25.74
ZmHXK4∆30	V _{max}	5.65 ± 0.12	3.05 ± 0.46	3.23 ± 0.22	1.83 ± 0.35
	Kcat	5.57	3.00	3.18	1.80
	k _{cat} /K _m	2.85 x 10 ⁴	1.55 x 10 ²	2.29 x 10 ⁴	1.34 x 10 ⁴
	Km	136.65 ± 20.01	30216.8. ± 5708.76	119.55 ± 33.30	135.60 ± 11.46
ZmHXK5∆30	V _{max}	4.55 ± 0.34	2.49 ± 0.29	2.77 ± 0.19	1.54 ± 0.56
	k cat	4.47	2.45	2.72	1.51
	k _{cat} /K _m	3.27 x 104	81.00	2.28 x 10 ⁴	1.12 x 10 ⁴
	Km	65.86 ± 15.19	4291.84 ± 1410.04	48.85 ± 1.06	198.85 ± 12.80
ZmHXK6∆30	V _{max}	3.60 ± 0.14	2.61 ± 0.47	3.08 ± 0.33	1.08 ± 0.32
	K cat	3.56	2.58	3.04	1.07
	k _{cat} /K _m	5.40 x 104	6.01 x 10 ²	6.23 x 104	5.36 x 10 ³
	Km	108.10 ± 17.96	2701.85 ± 590.93	123.79 ± 11.61	28.74 ± 0.30
ZmHXK7	V _{max}	27.19 ± 0.77	23.44 ± 0.30	21.33 ± 0.54	13.21 ± 0.48
	K cat	26.57	22.90	20.84	12.91
	k _{cat} /K _m	2.46 x 10 ⁵	8.48 x 10 ³	1.68 x 10 ⁵	4.49 x 10 ⁵
	Km	4687 ± 299.53	ND	10396.50 ± 54.31	147.20 ± 62.08
ZmHXK8	V _{max}	17.38 ± 0.24	ND	14.79 ± 0.99	10.91 ± 0.34
	K cat	17.15	ND	14.60	10.77
	K _{cat} /K _m	3.66 x 10 ³	ND	1.40 x 10 ³	7.32 x 10 ⁴

Tabla 8. Comparación de los parámetros cinéticos de las HXKs de maíz.

Para la determinación de la actividad con cada hexosa como sustrato, la concentración de ATP se fijó en 2 mM y cuando el ensayo de actividad se realizó utilizando ATP como sustrato, la concentración de Glu se fijó en 5 mM o 50 mM para el caso de ZmHXK8. Los parámetros cinéticos fueron obtenidos con el software 8.0 y representan la media y desviación estándar de seis réplicas independientes. ND: No determinada.

 K_m : μ M V_{max} : μ mol hexosa-6-P/min/mg. k_{cat} : s⁻¹.

Por otro lado, la eficiencia catalítica obtenida del análisis cinético permitió separar a las HXKs de maíz en dos grupos: uno de baja eficiencia catalítica, compuesto por un solo miembro, ZmHXK8; y el segundo grupo de alta eficiencia catalítica e integrado por ZmHXK4Δ30, ZmHXK5Δ30, ZmHXK6Δ30 y ZmHXK7 (Tabla 8).

En resumen, ZmHXK4-8 fueron capaces de fosforilar a las tres hexosas probadas presentando un comportamiento de tipo Michaeliano, con valores de K_m diferentes para cada sustrato (Tabla 8). Para el caso de ZmHXK4 Δ 30, ZmHXK5 Δ 30 y ZmHXK6 Δ 30 (proteínas presuntamente mitocondriales), la hexosa preferida fue la Man (Tabla 8) mientras que, para las potencialmente citosólicas ZmHXK7 y ZmHXK8 la hexosa preferida fue la Glu (Tabla 8). ZmHXK6 Δ 30 fue la proteína que tuvo la mayor afinidad por Glu y ZmHXK7 por Fru y ATP. Finalmente, ZmHXK8 presentó baja afinidad para todas las hexosas probadas, ya que los valores de K_m son un orden de magnitud más grande en comparación con las otras HXKs e incluso para el caso de la Fru, no se pudo determinar la K_m ya que la enzima no alcanzó la saturación aún en presencia de concentraciones muy elevadas del sustrato (Anexo 5).

Previamente, se había reportado que la actividad de HXK en fracciones mitocondriales de radículas de maíz se inhibía en presencia de ADP y NAG (Galina *et al.*, 1995). Por esta razón se decidió utilizar ADP, NAG y G6P (un inhibidor clásico de la actividad de HXK en mamíferos y levaduras, Cárdenas *et al.* 1998) con el objetivo de encontrar si el efecto inhibitorio de estos compuestos permitía distinguir a las isoformas presumiblemente mitocondriales ZmHXK4Δ30, ZmHXK5Δ30 y ZmHXK6Δ30, ya que los parámetros cinéticos fueron bastante similares entre ellas.

Las IC₅₀ calculadas para ADP y G6P permitieron agrupar a las HXKs de maíz en dos grupos, de manera similar a lo que ocurrió cuando se usó como criterio la tasa de recambio por Glu: ZmHXK4Δ30, ZmHXK5Δ30, ZmHXK6Δ30 con mayor sensibilidad a la inhibición por producto y ZmHXK7, ZmHXK8 como las menos sensibles (Tabla 9, Anexo 5). De manera particular, la G6P aun cuando se utilizó en concentraciones elevadas prácticamente no disminuyó la actividad de HXK de ZmHXK7 y ZmHXK8, es decir que no tuvo un efecto significativo (Tabla 9, Anexo 5). En el caso de la NAG, pareciera que todas las HXKs son igualmente sensibles a este compuesto (Tabla 9, Anexo 5).

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que las HXKs mitocondriales son más sensibles a la inhibición por producto, por lo cual los resultados obtenidos utilizando ADP y G6P como inhibidores apoya la idea de que ZmHXK4-6 son proteínas mitocondriales (Galina *et al.*, 1995; da-Silva *et al.*, 2001; Camacho-Pereira *et al.*, 2009).

		Inhibidor		
	ADP	NAG	G6P	
		IC₅₀ (mM)		
ZmHXK4∆30	0.71 ± 0.15	52.14 ± 16.42	47.49 ± 2.89	
ZmHXK5∆30	0.69 ± 0.15	46.80 ± 1.82	47.46 ± 1.44	
ZmHXK6∆30	0.72 ± 0.14	25.15 ± 2.25	53.54 ± 2.48	
ZmHXK7	6.47 ± 1.14	15.01 ± 3.24	NS	
ZmHXK8	3.12 ± 1.14	37.54 ± 1.63	NS	

Tabla 9. Comparación de los valores de IC50 de ADP, G6P y NAG para las diferentes HXKs de maíz.

Para la determinación de los valores de IC50, Glu y ATP fueron usados como sustratos a una concentración de 5 mM (50 mM para el caso de ZmHXK8) y 2 mM respectivamente. Los valores fueron obtenidos con el software Origin 8.0 y representan la media y desviación estándar de seis réplicas independientes. ND: No determinado. NS: No significativo.

3. Evaluación funcional de las HXK de maíz por expresión heteróloga en S. cerevisiae.

Este ensayo de complementación se realizó con la finalidad de verificar *in vivo* la actividad enzimática de las HKKs de maíz ZmHXK4-9. Para ello, se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* JT 20088, fondo genético W303-1a, que es incapaz de utilizar Glu o Fru como fuente de carbono, pues tiene interrumpidos los genes de las HXKs I, II y de la glucocinasa I; sin embargo, sí puede utilizar Galactosa (Gal) como fuente de carbono. Este fenotipo puede ser revertido si la levadura se complementa con una proteína que tenga actividad catalítica de HXK. Los genes ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6, ZmHXK7, ZmHXK8 y ZmHXK9 fueron clonados en el vector pDRf1 (donación de Wolf Frommer & Dominique Loque, plásmido de Addgene # 36026) y las clonas de expresión obtenidas se utilizaron para transformar a la cepa de *S. cerevisiae* JT 20088. Las HXKs de maíz, con excepción de ZmHXK9, fueron capaces de complementar la deficiencia en la levadura (Fig. 14). Estos resultados son consistentes con los datos de actividad *in vivo* de las distintas isoformas.

Aun cuando ZmHXK4-8 permitieron el crecimiento de la cepa mutante en medios suplementados con Glu o Fru, se encontraron algunas diferencias (Fig. 14). ZmHXK4-6 presentaron valores de K_m muy similares para Glu cuando se caracterizaron las proteínas recombinantes truncas en *E. coli*, sin embargo, las levaduras complementadas con ZmHXK5 y ZmHXK6 crecieron menos que aquellas levaduras que fueron complementadas con ZmHXK4, sugiriendo que el extremo N-terminal tiene un efecto sobre el crecimiento de las levaduras (Fig. 14). También se observó que las levaduras que expresaron a la proteína ZmHXK8 fueron las que crecieron menos cuando la fuente de carbono fue Fru, lo cual coincidió con las propiedades cinéticas obtenidas en su versión recombinante obtenida a partir de *E.coli* (Tabla 8).



Fig. 14. Ensayo de complementación de la actividad de HXK en S. cerevisiae con las versiones nativas de las HXKs de maíz.

Cuatro diferentes diluciones seriales se sembraron en medio selectivo con tres diferentes fuentes de carbono: galactosa (SGal-URA), Glu (SD-URA) y Fru (SFru-URA). Solamente ZmHXK9 no fue capaz de restaurar la actividad de HXK ni con Glu o Fru como fuente de carbono. Como control negativo, se transformaron levaduras con el vector vacío (pDRf1) y como control positivo se transformaron levaduras con AtHXK1. Imagen representativa de tres réplicas independientes.

Para explorar la posibilidad de que el extremo N-terminal tuviera un efecto sobre las HXKs de maíz ZmHXK4-6, el ensayo de complementación se realizó con las versiones truncas

ZmHXK4Δ30-6Δ30 y ZmHXK9Δ30. Todas las levaduras transformadas tanto con las versiones completas como con las versiones truncas tuvieron un nivel elevado del mRNA de las diferentes HXKs de maíz, excepto para ZmHXK9 (Anexo 6), el nivel bajo de mRNA para ZmHXK9 podría explicar su incapacidad de complementar a la levadura y coincide con que la *E. coli* transformada con ZmHXK9 fue incapaz de producir la proteína.

Se observó que todas las levaduras mutantes transformadas con las HXKs truncas crecieron mejor que aquellas transformadas con las HXKs completas e incluso ZmHXK9 Δ 30 fue capaz de complementar la deficiencia de actividad de HXK de la levadura (Fig. 15). Este resultado indica que ZmHXK4-9 actúan como verdaderas HXKs y además sugiere que los 30 aminoácidos del extremo N-terminal no solo hacen insolubles a ZmHXK4-6 y ZmHXK9 en *E. coli* sino que también modifican su actividad enzimática.



Fig. 15. Ensayo de complementación de la actividad de HXK en S. cerevisiae con las versiones truncas de las HXKs de maíz.

Cuatro diferentes diluciones seriales se sembraron en medio selectivo con tres diferentes fuentes de C: galactosa (SGal-URA), Glu (SD-URA) y Fru (SFru-URA). Las versiones truncas de las HXKs de maíz permitieron un mejor crecimiento de las levaduras cuando Glu o Fru fueron las fuentes de C. Incluso ZmHXK9∆30 fue capaz de complementar la deficiencia de HXK. Como control negativo se transformaron levaduras con el vector vacío (pDRf1). Imagen representativa de tres réplicas independientes.

B. Localización subcelular de las HXKs de maíz.

1. Predicción de la localización celular.

Para la predicción de la localización subcelular de las diferentes HXKs de maíz, se utilizaron los softwares TargetP 1.1 y Toppred 1.10. Se realizó una comparación con los primeros 60 aminoácidos de las proteínas AtHXK1, AtHXK2, OsHXK5 y OsHXK6 puesto que para las proteínas de A. *thaliana* y O. *sativa* ya se tiene evidencia experimental de su localización celular y se sabe que la región del N-terminal está involucrada en el anclaje de estas proteínas a la mitocondria (Balasubramanian et al., 2007; Karve et al., 2008; Cho et al., 2009).

El software TargetP 1.1 predice el compartimento celular en el cual es más probable que se encuentre la proteína de interés. Para ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9 el software sugirió que estas proteínas son secretadas (Tabla 10) al igual que AtHXK1, AtHXK2, OsHXK5 y OsHXK6 proteínas que ya se sabe se localizan en la membrana externa mitocondrial (Tabla 10, Giegé *et al.* 2003; Balasubramanian *et al.* 2007; Graham *et al.* 2007; Karve *et al.* 2008; Cho *et al.* 2009; Cheng *et al.* 2011). Por otro lado, el software sugirió que ZmHXK8 tiene un péptido señal de cloroplasto; en tanto que la predicción de la localización celular de ZmHXK7 fue incierta (Tabla 10).

Debido a la discrepancia observada entre las predicciones de localización celular obtenidas con TargetP y la evidencia experimental reportada para las proteínas AtHXK1, AtHXK2, OsHXK5 y OsHXK6, se decidió utilizar el software Toppred 1.10. Este software determina la existencia de regiones que pudieran formar cruces transmembranales y funcionar como secuencias de anclaje o de tránsito.

El análisis realizado con este software identificó en ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9 una secuencia de aproximadamente 24 aminoácidos hidrofóbicos localizados en la región del Nterminal que podrían actuar como cruces transmembranales (Tabla 10, Anexo 4). Estos resultados sugieren que ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9, al igual que AtHXK1-2 y OsHXK5-6, son proteínas de localización mitocondrial (Giegé *et al.*, 2003; Balasubramanian *et al.*, 2007; Graham *et al.*, 2007; Karve *et al.*, 2008; Cho *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2011). En cambio, en ZmHXK7 y ZmHXK8 no se identificó ninguna región potencial de cruce, similar a lo que ocurre con sus homólogos de arroz OsHXK7 y OsHXK8 que se sabe son HXKs tipo C o citosólicas (Cho *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2011), lo que indica que ZmHXK7 y ZmHXK8 también podrían tratarse de proteínas citosólicas (Tabla 10, Anexo 4).

Tabla 10. Predicción de la localización celular de las HXKs de maíz.

Proteína	Dominio transmembranal	Péptido de tránsito	Localización subcelular
AtHXK1	4-24	No	Vía secretoria
AtHXK2	4-24	No	Vía secretoria
OsHXK5	4-24	No	Vía secretoria
OsHXK6	8-28	No	Vía secretoria
OsHXK7	No	No	Otra
OsHXK8	No	No	Otra
ZmHXK4	4-24	No	Vía secretoria
ZmHXK5	4-24	No	Vía secretoria
ZmHXK6	9-29	No	Vía secretoria
ZmHXK7	No	No	Otra
ZmHXK8	No	No	Cloroplasto
ZmHXK9	4-24	No	Vía secretoria

La predicción de los dominios transmembranales y el péptido de tránsito fueron hechos con el software Toppred 1.10 y tomando en cuenta toda la secuencia de aminoácidos. Por otro lado, la predicción de la localización subcelular fue hecha con el software TargetP 1.1 y sólo considerando los primeros 60 aminoácidos de cada HXK.

2. Expresión de las HXKs de maíz fusionadas a GFP.

Para determinar la localización de cada una de las HXKs se realizó la transformación transitoria de protoplastos de plantas de A. *thaliana* ecotipo Col-0 con las HXKs fusionadas por el extremo C-terminal a GFP. Como controles negativos se utilizaron protoplastos sin transformar y protoplastos transformados con el vector vacío, pEarleyGate 103 (Anexo 7, Earley *et al.*, 2006) y como control positivo protoplastos transformados con el vector HBT-sGFP (S65T)-NOS (Anexo 7, Stock # CD3-911 de ABRC/https://www.arabidopsis.org).

Se encontraron dos patrones de localización: Para las proteínas ZmHXK4:GFP, ZmHXK5:GFP, ZmHXK6:GFP y ZmHXK9:GFP se observan puntos delimitados de fluorescencia, típicos de localización mitocondrial que no colocalizaron con la autofluorescencia de la clorofila (Anexo 7); mientras que para las proteínas ZmHXK7:GFP y ZmHXK8:GFP se observó un patrón de fluorescencia distribuido por toda la célula que claramente excluye la localización de los cloroplastos (Anexo 7), sugerente de que se trata de proteínas citosólicas. Esto coincide con las predicciones basadas en el análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de dichas proteínas (Karve *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014).

Para confirmar la localización mitocondrial, se realizó una tinción con Mitotracker, un colorante específico de mitocondria. Además, se incluyó a la proteína AtHXK1 como un control de localización mitocondrial. Se encontró que las proteínas ZmHXK4:GFP, ZmHXK5:GFP, ZmHXK6:GFP y ZmHXK9:GFP claramente co-localizaron con el canal del Mitotracker, al igual

que AtHXK1 (señales en amarillo, Fig. 16), mientras que ZmHXK7 y ZmHXK8 no, estas se encontraron distribuidas de manera uniforme en toda la célula (Fig. 17).



Fig. 16. HXKs de maíz localizadas en la mitocondria.

Proyecciones en Z de las imágenes obtenidas con el microscopio confocal de protoplastos expresando las versiones completas de A) ZmHXK4, B) ZmHXK5, C) ZmHXK6 y D) ZmHXK9 fusionadas a la proteína GFP por el extremo C-terminal. Todas las proteínas fueron observadas como puntos distribuidos a lo largo de la célula. La señal de GFP se muestra en verde; el Mitotracker fue utilizado como marcador de localización mitocondrial y se muestra en rojo. Como control de tinción y localización mitocondrial E) AtHXK1 fue utilizada. La superposición corresponde a las señales de los canales de campo claro, GFP y Mitotracker. Imágenes representativas de al menos cuatro réplicas independientes.



Fig. 17. HXKs de maíz localizadas en el citosol.

Proyecciones en Z de las imágenes obtenidas con el microscopio confocal de protoplastos expresando A) ZmHXK7 y B) ZmHXK8 fusionadas a la proteína GFP por el extremo C-terminal. Estas proteínas se distribuyeron de forma homogénea por toda la célula, excluyendo a los cloroplastos y las mitocondrias, patrón típico de las proteínas citosólicas, tal como se puede observar en el caso de la proteína GFP sola (C). La señal de GFP se muestra en verde; el Mitotracker fue utilizado como marcador de localización mitocondrial y se muestra en rojo. La superposición corresponde a las señales de los canales de campo claro, GFP y Mitotracker. Imágenes representativas de al menos cuatro réplicas independientes.

Puesto que la predicción de la localización celular sugería que en la región del N-terminal podría estar presente un péptido de tránsito que dirigiera a las HXKs de maíz 4, 5, 6 y 9 a la mitocondria, se decidió evaluar la localización de las versiones truncas Δ30. Se observó que la distribución en la célula fue diferente respecto a las versiones completas de las proteína (Fig. 18), así ZmHXK4Δ30:GFP, ZmHXK5Δ30:GFP y ZmHXK9Δ30:GFP se localizaron en el citoplasma de forma similar a las proteínas ZmHXK7:GFP y ZmHXK8:GFP (Fig. 17). Para el caso de ZmHXK6Δ30:GFP, la localización fue incierta, diferente respecto a la versión completa, pero no se encontró en la mitocondria ni tampoco en el citosol (Fig. 18C); el patrón parece asemejarse al de las proteínas nucleares, sin embargo es necesario realizar otros ensayos para confirmarlo;

por ejemplo colocalizaciones con marcadores nucleares o colorantes como DAPI o Hoechst. Para ZmHXK4, ZmHXK5 y ZmHXK9 este resultado indica que los primeros 30 aminoácidos del extremo N-terminal son necesarios y suficientes para dirigirlas a la mitocondria, además de modificar su actividad enzimática (Fig. 15).



Fig. 18. La región del N-terminal dirige a las HXKs de maíz a la mitocondria.

Proyecciones en Z de las imágenes obtenidas con el microscopio confocal de protoplastos expresando las versiones truncas A) ZmHXK4Δ30, B) ZmHXK5Δ30, C) ZmHXK6Δ30 y D) ZmHXK9Δ30. ZmHXK4Δ30, ZmHXK5Δ30 y ZmHXK9Δ30 se localizaron en el citosol, mientras que ZmHXK6Δ30 mostró un patrón de fluorescencia difusa en el citosol y algunos agregados. La señal de GFP se muestra en verde; el Mitotracker fue utilizado como marcador de localización mitocondrial y se muestra en rojo. La superposición corresponde a las señales de los canales de campo claro, GFP y Mitotracker. Imágenes representativas de al menos cuatro réplicas independientes.

C. Complementación de la mutante A. thaliana gin 2-1 con las HXKs de maíz.

Con el objetivo de encontrar si alguna isoforma de las HXKs de maíz pudiese actuar como sensor de Glu, se llevó a cabo un ensayo de complementación de las mutantes de A. *thaliana* gin 2-1, con las versiones completas de las HXKs ZmHXK4-9.

Para cada gen ZmHXK se evaluaron al menos dos líneas mutantes independientes transformadas; se verificó la expresión del gen de maíz y que la expresión de AtHXK1, HXK sensor, fuese casi nula. En todas las líneas seleccionadas se detectó el mRNA de las diferentes HXKs de maíz. (Fig. 19).



Fig. 19. Expresión de AtHXK1 y las diferentes HXKs de maíz en plantas silvestres y en mutantes gin 2-1.

Electroforesis representativa de los perfiles de expresión de los mRNA de AtHXK1 y ZmHXKs en plantas silvestres, mutantes gin 2-1 y mutantes gin 2-1 complementadas con las diferentes HXKs de maíz. Se evaluaron dos líneas independientes de cada mutante complementada y se observó que en todos los casos la expresión de AtHXK1 es casi nula (excepto en la planta silvestre) mientras que, la expresión de los transgenes fue elevada. El tamaño esperado de cada uno de los productos fue de AtHXK1: 505 pb; ZmHXK4: 480 pb; ZmHXK5: 480 pb; ZmHXK6: 147 pb; ZmHXK7: 130 pb; ZmHXK8: 180 pb y ZmHXK9: 137 pb. Imágenes representativas de tres réplicas independientes.

Posteriormente, para evaluar la respuesta de sensibilidad a Glu con relevancia fisiológica, se utilizó agar al 1% suplementado únicamente con Glu al 2%, un medio libre de nitrógeno (Moore *et al.*, 2003; Cho, Sheen & Yoo, 2010). Se encontró que tanto las plantas silvestres como las

complementadas con ZmHXK4-8 (dos líneas independientes de cada una) mostraron arresto del desarrollo, el cual se evidenció por la presencia de antocianina en los cotiledones cuando crecieron en presencia de Glu al 2% (Fig. 20, Anexo 8). En contraste, en el medio suplementado con Manitol al 2% todas las plantas enverdecieron y desarrollaron sus cotiledones, indicando que el fenómeno observado con Glu es específico y no una consecuencia del efecto osmótico (Fig. 20). Por otro lado, tanto las mutantes *gin2-1* como las dos líneas independientes de plantas transformadas con ZmHXK9 mostraron cotiledones verdes y fueron capaces de establecerse en presencia de Glu al 2% (Fig. 20, Anexo 8).







Fig. 20. Evaluación fenotípica de las líneas mutantes gin 2-1 complementadas con las diferentes HXKs de maíz. Las plántulas de cada una de las líneas silvestres, mutantes y complementadas fueron sembradas en agar al 1% suplementado con Manitol al 2% (como control osmótico) o Glu al 2% y se incubaron durante seis días a 22°C, luz continua. En presencia de Manitol, todas las plántulas lograron establecerse mientras que, en el caso de Glu al 2% todas las líneas complementadas (excepto ZmHXK9) y la línea silvestre mostraron arresto del desarrollo. Imágenes representativas de cuatro réplicas independientes.

Por otro lado, se sabe que la vía de señalización por Glu mediada por HXK también afecta la expresión de algunos genes fotosintéticos (Jang *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2003; Cho, Yoo & Sheen, 2006; Cho *et al.*, 2009; Karve *et al.*, 2010) por ejemplo, el de la proteína de unión a clorofila A/B (CAB2), la anhidrasa carbónica (CAA), la sedoheptulosa bifosfatasa (*SBP*) entre otros. Para el caso particular del gen *CAB2* se sabe que AtHXK1 forma un complejo represor transcripcional con las subunidades RPT5B del proteosoma y con VHA-B1 de la ATPasa vacuolar (Cho, Yoo & Sheen, 2006), es por ello que se decidió seleccionar este gen para la evaluación molecular de la actividad sensor de Glu de las HXKs de maíz. Para ello, se obtuvo mRNA de plántulas de las diferentes líneas en presencia de Glu 2% y Man 2% como control osmótico (Fig. 21A).

Se encontró que, tal como se había reportado, la línea de A. *thaliana* que carece de la HXK1 pierde la sensibilidad a Glu, razón por la cual la represión del gen CAB2 no ocurre tal como sucede en la línea silvestre (Fig. 21B; Jang *et al.* 1997; Moore *et al.* 2003; Cho *et al.* 2006; Cho *et al.* 2009; Karve *et al.* 2010). En el caso de las mutantes complementadas se observó que todas las HXKs de maíz tienen la capacidad de restaurar el efecto represor de la Glu sobre el gen CAB2 (Fig. 21). Este resultado sugiere que las HXKs de maíz participan en los mecanismos de

regulación dependientes de la abundancia de Glu, pero que podrían ser distintos ya que su localización y su capacidad de unión a Glu (K_m) son diferentes.



Fig. 21. Evaluación de la expresión del gen CAB2 en las líneas mutantes gin 2-1 complementadas con las diferentes HXKs de maíz.

Electroforesis representativa de A) la integridad del RNA de las diferentes líneas evaluadas y de B) los perfiles de expresión del mRNA del gen CAB2 en plantas silvestres, mutantes gin 2-1 y mutantes gin 2-1 complementadas con las diferentes HXKs de maíz. Se evaluaron dos líneas independientes de cada mutante complementada y se observó que, en todos los casos, excepto en la mutante gin2-1 la expresión de CAB2 se reprime en presencia de Glu al 2%. Las plántulas de cada una de las líneas silvestres, mutantes y complementadas fueron sembradas en agar al 1% suplementado con Manitol al 2% (como control osmótico) o Glu al 2% y se incubaron durante seis días a 22°C, luz continua. Como gen de referencia se utilizó el gen de la Adenina fosfotransferasa 1 (APT1). G, Glu; M, Manitol. Imágenes representativas de tres réplicas independientes.

D. Expresión de las HXKs de maíz durante el proceso de germinación.

La germinación de la semilla es un evento crucial en el ciclo de vida de las plantas, la restauración de la actividad metabólica y la movilización de reservas durante este proceso son pasos claves para mantener el establecimiento de la plántula antes de que se vuelva un organismo fotosintéticamente activo (Srivastava, 2002). La actividad de HXK en fracciones citosólicas se ha detectado a las pocas horas de imbibición de embriones de maíz (Sánchez-Linares *et al.*, 2012), así como la actividad de las HXKs tanto citosólicas como mitocondriales durante la germinación (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado que el uso de análogos no metabolizables como 2DOG, Man y Glucosamina, que son sustrato de la HXK, inhibe el proceso de germinación de las semillas (Matheson & Myerst, 1998). Esta evidencia junto con el hecho de que durante la germinación hay un incremento en la concentración de hexosas fosforiladas, revela la importancia de la actividad de HXK en el proceso de germinación (Han & Yang, 2015).

Con base en lo anterior y con el objetivo de generar información acerca de cómo las HXKs de maíz podrían participar en el proceso de germinación, se evaluó mediante PCR punto final y qPCR (realizado por la M. en C. Beatriz King Díaz) el perfil de expresión del mRNA las HXKs catalíticas ZmHXK4-9 en embriones de maíz durante las primeras 48 h de imbibición.

Se encontró que las seis HXKs analizadas se expresaron durante la germinación, sin embargo, cada uno de los genes mostró un perfil de expresión particular (Fig. 22). El mRNA de *ZmHXK4* y *ZmHXK7* se encontró en niveles muy bajos en los embriones de maíz secos (Fig. 22B), lo que indica que podrían estar participando en la embriogénesis o bien, que podrían ser necesarios para la germinación ya que permanecen aún después del proceso de desecación. Por otro lado, *ZmHXK7, ZmHXK8* y *ZmHXK9* mostraron un incremento constante a lo largo de la germinación (Fig. 22A), siendo *ZmHXK7* la que presentó el mayor grado de expresión (Fig. 22B). A las 48 h todas las HXKs analizadas, excepto *ZmHXK5*, mostraron su grado de expresión más alto (Fig. 22B).





A) Electroforesis representativa de amplicones de cDNA analizados por RT-PCR punto final y B) cuantificación de los perfiles de expresión de los mRNA de la familia de HXKs de maíz analizados por qRT-PCR (realizado por la M. en C. Beatriz King Díaz). Los genes correspondientes a las HXKs verdaderas de maíz se expresaron durante la germinación. Casi todas mostraron la expresión máxima a las 48 h de imbibición. Como control del cargado, se utilizó RNA ribosomal, mientras que para el qPCR Zm18s se utilizó como control endógeno. Los puntos graficados representan la media y la desviación estándar de tres réplicas independientes.

DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN.

En este trabajo de investigación, se realizó la clonación, el análisis funcional y molecular de seis de los nueve miembros de la familia de HXKs en maíz. Se comprobó que las HXKs ZmHXK4-9, las cuáles poseen el mayor porcentaje de similitud con otras HXKs catalíticamente activas, funcionan como verdaderas HXKs. Hay que mencionar que este es el primer trabajo que caracteriza a múltiples HXKs de plantas lo que permite compararlas bajo las mismas condiciones de ensayo. Pocas familias de HXKs en plantas han sido caracterizadas bioquímicamente (Aguilera-Alvarado & Sánchez-Nieto, 2017).

También se demostró que dichas HXKs de maíz tienen diferencias respecto a la especificidad del sustrato: la hexosa por la que presentaron mayor afinidad fue la Man, seguida de la Glu; sin embargo, también se observó que la V_{max} obtenida cuando la Man se utilizó como sustrato, fue mucho menor respecto a la calculada con Glu. Este comportamiento se ha encontrado en otras HXKs de plantas (Veramendi *et al.*, 1999; Claeyssen & Rivoal, 2007; Troncoso-Ponce *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2013).

Por otro lado, la eficiencia catalítica obtenida del análisis cinético permitió separar a las HXKs de maíz en dos grupos: uno de baja eficiencia catalítica, compuesto por un solo miembro, ZmHXK8; y el segundo grupo de alta eficiencia catalítica e integrado por ZmHXK4Δ30, ZmHXK5Δ30, ZmHXK6Δ30 y ZmHXK7. Estas diferencias en conjunto con la afinidad de cada una de las HXKs por ATP y su sensibilidad a ADP, NAG y G6P indican que estos miembros de la familia de HXKs en maíz podrían tener un papel metabólico específico o responder de distinta manera a las condiciones ambientales o fisiológicas de la planta. Por ejemplo, en V. vinífera se encontró que la actividad de HXK se redujo de manera simultánea al incremento de hexosas libres durante la maduración de la uva (Wang *et al.*, 2014); en este caso la expresión de una HXK que no alcance la saturación, como ZmHXK8 (Tabla 8), podría ser importante para mantener el desarrollo del fruto.

Por el contrario, una HXK con eficiencia catalítica alta, como ZmHXK4-7, podría ser requerida en otras situaciones. Por ejemplo, en plastidios heterotróficos, la actividad de HXK suministra la G6P necesaria para la biosíntesis de ácidos grasos (Rawsthorne, 2002). De manera similar, durante el desarrollo de las semillas de girasol y maíz, el incremento en la actividad de HXK coincide con la fase activa de la biosíntesis de ácidos grasos, sugiriendo que la G6P se utiliza para producir NADPH a través de la vía oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP) con el objetivo

DISCUSIÓN

de impulsar la biosíntesis de ácidos grasos (Troncoso-Ponce et al., 2009, 2011; Alonso, Dale & Shachar-Hill, 2010).

Por otro lado, en embriones de maíz en desarrollo, dos HXKs citosólicas fueron purificadas y se encontró una diferencia bastante considerable en el valor de *K*_m para Glu entre ellas (Cox & Dickinson, 1973; Doehlert, Kuo & Felker, 1988). De acuerdo a las características de cinética y solubilidad encontradas en este trabajo, la actividad anteriormente descrita podría ser atribuida a ZmHXK7 y ZmHXK8. Es posible que durante el desarrollo de las semillas ambas enzimas produzcan una gran cantidad de G6P para alimentar las vías de OPPP y la biosíntesis de ácidos grasos con el objetivo de almacenar reservas en el escutelo (Alonso, Dale & Shachar-Hill, 2010).

Finalmente, en relación a la afinidad por los sustratos, se encontró que todas las HXKs de maíz mostraron afinidad baja por Fru de manera similar a las HXKs de levadura, rata, parásitos, semillas de chícharo, papa y espinaca (Cárdenas, Rabajille & Niemeyer, 1984; Cárdenas, Cornish-Bowden & Ureta, 1998; Claeyssen & Rivoal, 2007; Sun *et al.*, 2016). A diferencia de las fructocinasas, se ha sugerido que *in vivo* las HXKs preferiblemente fosforilan Glu y no Fru ya que los valores de K_m obtenidos para algunas fructocinasas oscilan entre 0.06 y 0.10 mM, mientras que los de HXK se encuentran entre 8.7 y 22 mM (Renz & Stitt, 1993; Renz, Merlo & Stitt, 1993; Pego & Smeekens, 2000; Granot, David-Schwartz & Kelly, 2013). Esto es relevante fisiológicamente, ya que como se ha mencionado anteriormente, las HXKs son las únicas enzimas capaces de fosforilar Glu en plantas (Claeyssen & Rivoal, 2007).

Otra característica interesante de las HXKs ZmHXK4-6 y ZmHXK9 es que los primeros 30 aminoácidos del extremo N-terminal no sólo hicieron a estas proteínas insolubles en *E. coli*, sino que también modificaron su actividad en la mutante de levadura. Algunas razones que explicarían este fenómeno son las siguientes: primero, es probable que ZmHXK4-6 y ZmHXK9 se encuentren unidas a la mitocondria, una característica que podría ser relevante dado que en la levadura silvestre las tres enzimas capaces de fosforilar hexosas se localizan en el citosol; por lo tanto una HXK con diferente localización celular podría afectar la disponibilidad del sustrato (Randez-Gil *et al.*, 1998). La segunda razón es que las versiones completas de estas proteínas formen agregados en el citosol y por lo tanto se reduzca su actividad. La tercera razón es que el extremo N-terminal de estas HXKs se inserte en la membrana mitocondrial de la levadura de una manera diferente a como lo hace en la planta resultando en una actividad enzimática

alterada. Estas y algunas otras posibilidades que no han sido consideradas aquí podrían ser responsables de la modificación de la actividad de HXK, sin embargo, hace falta demostrarlo, por ejemplo, mediante ensayos de localización celular en levadura, elaborando quimeras de los primeros 30 aminoácidos de ZmHXK4-6 y ZmHXK9 con otras HXKs solubles como ZmHXK7-8 o bien, las HXKs de levadura.

Adicionalmente, la eliminación de los 30 aminoácidos del extremo N-terminal de ZmHXK9 permitió demostrar que esta proteína posee actividad enzimática, aunque mínima, pero que es suficiente para permitir el crecimiento de la levadura mutante en un medio suplementado con Glu o Fru como únicas fuentes de carbono. Por lo tanto, esto permite aseverar que ZmHXK4-9 son verdaderas HXKs funcionales, aun cuando ZmHXK9 tiene una actividad enzimática marginal cuya relevancia fisiológica es incierta.

Por esto y con el objetivo de explicar la baja actividad de ZmHXK9, se llevó a cabo un análisis de estructura primaria de esta proteína y se encontraron algunos aminoácidos que podrían estar afectando de manera negativa la catálisis (Anexos 2 y 3).

 De acuerdo al modelo tridimensional de ScHxkll, la enzima tiene un canal hidrofóbico que es esencial para disipar el gradiente de H⁺ generado durante la reacción de fosforilación: si los H⁺ generados se mantienen cerca del sitio catalítico, podrían prevenir la repulsión natural entre la G6P y el fosfato-β del ADP y por lo tanto la liberación de los productos (Kuser *et al.*, 2000). En ZmHXK9 se encontraron varias sustituciones sinónimas en los aminoácidos que conforman el canal hidrofóbico lo cual podría afectar la actividad de la enzima aun cuando la hidrofobicidad del canal se mantenga.

2) Las HXKs están compuestas por un dominio pequeño y un dominio grande los cuales están conectados por una a-hélice que funciona como bisagra. ZmHXK9 tiene una región adicional de seis aminoácidos polares en el dominio grande muy cerca de la bisagra (Anexo 3 Feng *et al.* 2015). Estos aminoácidos no están presentes en otras HXKs de maíz, arroz o A. *thaliana* y podrían ser críticos para la catálisis. La unión de la Glu en el dominio grande induce un cambio conformacional que permite el acercamiento de los dos dominios alrededor de los sustratos y promueve el contacto. Se ha sugerido que, un dominio grande más prolongado podría afectar la flexibilidad de la bisagra y reducir el contacto entre los dominios (Feng *et al.*, 2015b).

3) En el segundo loop se detectaron dos sustituciones de aminoácidos en ZmHXK9. El cambio de Pro¹³³→Glu¹³³ (posición relativa a AtHXK1) también está presente en las HKLs de A. *thaliana* y arroz (Karve et al., 2008, 2010) y sugiere una alteración en la orientación del loop, lo cual incrementa la flexibilidad de la enzima y afecta la unión de la Glu (Kuser et al., 2000).

4) Un efecto similar en la movilidad de la enzima podría producirse por el cambio de Gly³¹⁰ →Asp³¹⁰ (Anexo 2,Feng *et al.* 2015). La Gly310 se encuentra conservada en las HXKs catalíticamente activas pero está ausente en las HKLs por ejemplo, AtHXL1, AtHXL2, OsHXL3 y OsHXL10 y en las proteínas de maíz que se predice son HXL, ZmHXK3a, ZmHXK3b y ZmHXK10 (Kuser *et al.*, 2000, 2008, Karve *et al.*, 2008, 2010).

El efecto cooperativo de todos estos cambios podría ser responsable de la actividad mínima mostrada por ZmHXK9.

Adicionalmente, hay que mencionar que la producción de la proteína de la versión completa de ZmHXK9 no se logró en *E. coli* y es posible que tampoco en levadura, ya que no pudo complementar a la mutante de levadura, la cual expresó una cantidad menor de mensajero con respecto a las otras HXKs (Anexo 6), lo anterior podría sugerir que probablemente hay algún tipo de regulación transcripcional que permita su transcripción en ciertas condiciones y/o que sean propias de un estado de desarrollo de la planta del maíz. Respecto a lo anterior, la detección de los transcritos de ZmHXK9 durante la germinación del maíz, permite sugerir que el maíz si tiene las condiciones necesarias, ya sea de proteínas o metabolitos que permiten que ZmHXK9 se transcriba, y en tal caso esta enzima podría ser importante durante la germinación.

Por otro lado, las respuestas metabólicas a las concentraciones de sustrato y producto, combinadas con la localización celular pueden contribuir a la actividad y función de las HXKs. Como ya mencionó anteriormente, en plantas estas proteínas puede clasificarse en cuatro tipos con base en su localización celular (Nilsson *et al.*, 2011). En maíz, se había sugerido que las HXKs podrían estar localizadas en citosol, membrana externa mitocondrial, vacuola e incluso retículo endoplásmico (Galina *et al.*, 1995; da-Silva, Rezende & Galina, 2001; Karve *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014). Para diferenciar las HXKs citosólicas de las mitocondriales, la primera estrategia que se siguió fue la de determinar el efecto de los inhibidores ADP, NAG y G6P puesto que ya se había reportado que la actividad de HXK presente en fracciones mitocondriales es sensible a estos compuestos, mientras que la presente en la fracción soluble no. Esta estrategia permitió diferenciar dos tipos de HXKs en maíz: las que son altamente

sensibles a estos inhibidores (ZmHXK4-6) y las de baja sensibilidad (ZmHXK7-8). Este resultado en conjunto con los de localización celular usando las versiones truncas y completas de las HXKs de maíz fusionadas a GFP confirmó que en maíz existen solo dos tipos de HXKs: las del tipo B o mitocondriales y las del tipo C o citosólicas, en estas últimas se encuentran ZmHXK7-8. Además, las HXKs tipo B de maíz contienen una secuencia de aminoácidos en la región del extremo N-terminal que las dirige a la mitocondria. Particularmente para el caso de ZmHXK4, ZmHXK5 y ZmHXK9 los primeros 30 aminoácidos son necesarios y suficientes para anclar estas proteínas a la membrana mitocondrial, además de modificar su actividad enzimática (Fig. 15, 16 y 18).

Para ZmHXK6 el papel de los primeros 30 aminoácidos no es claro, debido que la poca cantidad de proteína citosólica encontrada estaba acompañada de una gran cantidad de agregados fluorescentes (Fig. 18C). Este patrón de fluorescencia también se ha observado en otras HXKs tipo B (Kandel-Kfir et al., 2006; Balasubramanian et al., 2007; Cho et al., 2009). Esto podría deberse a: 1) expresión muy elevada de la proteína lo cual podría favorecer su agregación en el citosol (Karve et al., 2008; Nilsson et al., 2011); 2) un plegamiento inadecuado causado por la pérdida de los primeros 30 aminoácidos; 3) defectos en la región N-terminal que estén dirigiendo a la proteína a otra localización celular, considerando que ZmHXK6 sólo perdió una región altamente hidrofóbica mientras que ZmHXK4, ZmHXK5 y ZmHXK9 perdieron la región hidrofóbica más dos aminoácidos básicos adyacentes a la misma. En arroz, OsHXK5 y OsHXK6 poseen dos secuencias de localización, la hidrofóbica que ancla a dichas proteínas a la membrana mitocondrial seguida de una secuencia de localización nuclear (NLS). Dicha NLS se compone de 16 a 21 aminoácidos básicos (Cho et al., 2009). En levadura, la translocación de ScHxkll al núcleo se debe a la presencia de una NLS compuesta por una gran cantidad de aminoácidos básicos (Moreno & Herrero, 2002). Esto sugiere que los agregados fluorescentes encontrados en los protoplastos transformados con la construcción p35S:ZmHXK6Δ30:GFP podrían deberse a la localización nuclear de dicha proteína. Se ha demostrado que algunas HXKs migran al núcleo y para el caso particular de AtHXK1, esta forma un complejo represor de genes fotosintéticos con las proteínas VHA-B1 y RPTB5B, complejo que se encontró en núcleo (Yanagisawa, Yoo & Sheen, 2003; Cho, Yoo & Sheen, 2006; Aki & Yanagisawa, 2009; Cho et al., 2009). Este trabajo abre la posibilidad de estudiar los aminoácidos que podrían estar involucrados en la translocación mitocondrial/nuclear de las HXKs de maíz y el mecanismo de translocación al núcleo, que a la fecha no ha sido descrito.

DISCUSIÓN

Las HXKs mitocondriales están involucradas en un gran número de procesos fisiológicos como consecuencia de su estratégica localización celular, la cual se ha sugerido representa una ventaja para el uso eficiente del ATP. Por ejemplo, en A. *thaliana* algunas HXKs se encuentran embebidas en la membrana externa mitocondrial formando parte de un metabolón glucolítico (Giegé *et al.*, 2003; Graham *et al.*, 2007). La eficiente canalización del ATP mitocondrial hacia la HXK unida a la membrana externa mitocondrial ha sido descrito en plantas de betabel (Alcántar-Aguirre *et al.*, 2013).

Otro papel importante de las HXKs mitocondriales es la protección contra las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la muerte celular programada (PCD). En papa, las HXKs mitocondriales regulan la producción de ROS en tejidos con un metabolismo altamente oxidativo (Camacho-Pereira *et al.*, 2009). En tabaco, la HXK mitocondrial protege contra la muerte celular programada (PCD) inducida por ROS y confiere resistencia contra el ataque de patógenos (Kim *et al.*, 2006; Sarowar *et al.*, 2008). Nosotros sugerimos que como consecuencia de la gran variedad de HXKs tipo B en maíz, cada una puede jugar un papel diferente en la célula. La determinación de la expresión de las diferentes HXKs en diferentes estados del desarrollo, condiciones ambientales o de estrés podrían dar evidencia del papel de cada una de las HXKs en maíz.

Por otro lado, las HXKs citosólicas juegan un papel importante en la producción de ATP principalmente a través de la fermentación y durante el proceso de germinación en condiciones hipóxicas (Kim *et al.*, 2016). La ausencia de una HXK cloroplástica (tipo A) en maíz sugiere que la Glu debe ser exportada del cloroplasto, el cual es producido durante la degradación del almidón, y podría ser fosforilada por las HXKs citosólicas (Nilsson *et al.*, 2011). Tanto ZmHXK7 como ZmHXK8 podrían participar en estos procesos.

Además, el papel fisiológico de cada HXK no solo depende de su actividad catalítica y su localización celular, sino también de su función como sensor de Glu. En maíz, se ha sugerido que los elementos involucrados en las vías de señalización por Glu y dependientes de HXK están presentes. Esto se observó gracias a experimentos en protoplastos de maíz en los cuales se utilizaron análogos no metabolizables de Glu, inhibidores específicos de la actividad de HXK o bien, en los que se llevó a cabo la expresión transitoria de AtHXK1; sin embargo hasta ahora no se ha logrado identificar a alguna HXK de maíz que funcione como proteína sensor de Glu (Sheen, 1990; Jang & Sheen, 1994; Jang *et al.*, 1997; Yanagisawa, Yoo & Sheen, 2003).
A pesar de que se ha demostrado que la función de la HXK como proteína sensor de Glu es independiente de su actividad catalítica de fosforilación de hexosas, la mayoría de las HXKs que tienen esta función sensor también poseen la capacidad de fosforilar hexosas (Aguilera-Alvarado & Sánchez-Nieto, 2017). Es por ello que se decidió determinar si las proteínas que en este trabajo ya se habían establecido como verdaderas HXKs también podrían actuar como sensores de Glu.

Del análisis *in silico* se encontró que ZmHXK4-7 tienen un porcentaje de similitud elevado con otras proteínas cuya actividad como sensor de Glu ya se ha demostrado (Moore *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2009; Karve *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016) por lo que se esperaba que al menos estas proteínas fueran sensores de la abundancia de Glu.

El ensayo de complementación en la mutante de A. *thaliana* insensible a concentraciones elevadas de Glu gin 2-1 permitió demostrar que cinco de las seis proteínas con actividad catalítica (ZmHXK4-8) son capaces de restablecer el fenotipo de sensibilidad a Glu (Fig. 20). Las características fenotípicas que usualmente se analizan en las mutantes complementadas con las HXKs en medios suplementados con Glu en concentraciones elevadas, fueron el retraso en el desarrollo de los cotiledones y del enverdecimiento así como la acumulación de antocianinas (Jang et al., 1997; Moore et al., 2003; Ryu et al., 2008; Cho et al., 2009; Cho, Sheen & Yoo, 2010; Kim et al., 2013, 2016). Las plantas mutantes de A. *thaliana* complementadas con ZmHXK9 fueron las únicas capaces de crecer de manera similar a la cepa mutante gin 2-1 mostrando una coloración verde de los cotiledones (Fig. 20), por lo que de acuerdo con este criterio esta enzima no sería capaz de ser una proteína sensor de la abundancia de Glu.

Sin embargo, al llevar a cabo el análisis de la represión del gen CAB2 que se sabe ocurre por la vía de señalización por Glu mediado por HXK (Cho, Yoo & Sheen, 2006), se encontró que todas las HXKs de maíz probadas reprimieron su expresión al igual que ocurrió con la planta tipo silvestre en presencia de elevadas concentraciones de Glu (Fig. 21). Como se mencionó anteriormente, gracias al análisis de la estructura cristalográfica de propuesto que la función sensor podría estar relacionada con la elevada afinidad a Glu (Feng *et al.* 2015). En este caso, ZmHXK9 podría unirse con gran afinidad a Glu pero no fosforilarla, por lo cual sí podría actuar como un sensor de Glu.

Además, cabe resaltar que a pesar de las diferencias encontradas en relación con la afinidad a Glu, pareciera que todas las HXKs de maíz reprimieron a CAB2 con la misma eficiencia. Esto

DISCUSIÓN

podría deberse a que en la concentración de Glu utilizada para llevar a cabo el ensayo (111 mM) todas las HXKs estarían saturadas y podrían llevar a cabo su función como sensor.

Lo anterior sugiere que las HXKs de maíz participan en distintos mecanismos de regulación cuando las concentraciones de Glu son elevadas. En relación con la acumulación de antocianinas, se sabe que, tanto la sacarosa como la Glu en concentraciones elevadas inducen su síntesis (Koornneef & Smeekens, 2005). Se ha demostrado que MdHXK1, una proteína homóloga a AtHXK1, es capaz de funcionar como una proteína cinasa, fosforilando y estabilizando a la proteína MdbHLH3, un factor de transcripción que promueve la acumulación de antocianinas en respuesta a las señales de Glu (Hu *et al.*, 2016). Este mecanismo de señalización involucra a la región de la HXK comprendida entre los aminoácidos 245-498 y la formación de un complejo con MdbHLH3 (Hu *et al.*, 2016).

Por otro lado, para la represión del gen CAB2, se ha demostrado que AtHXK1 forma un complejo represor con las subunidades RPT5B del proteasoma y con VHA-B1 de la ATPasa vacuolar (Cho, Yoo & Sheen, 2006). En este caso se sabe que la interacción entre estas tres proteínas es esencial para que ocurra el efecto represor a concentraciones elevadas de Glu, pero no se han identificado las regiones necesarias de contacto entre cada una de estas proteínas para la formación del complejo.

Adicionalmente, los dos mecanismos de señalización descritos anteriormente, la acumulación de antocianinas y la represión del gen CAB2, dependen de la localización nuclear de los complejos que forma la HXK para poder llevar a cabo su función sensor (Cho, Yoo & Sheen, 2006; Hu *et al.*, 2016). En plantas y animales se han propuesto diferentes mecanismos para la migración de una proteína de un compartimento celular al núcleo: generación de isoformas diferentes mediante "splicing" alternativo, inicio alternativo de la transcripción o de la traducción, mediante la acción de proteasas, o bien, a través de un mecanismo de distribución eclipsada (Duchêne & Giegé, 2012; Monaghan & Whitmarsh, 2015). En el caso de las HXKs de maíz, la utilización de diferentes mecanismos de migración al núcleo podría afectar también su participación en los distintos procesos de señalización.

Con estos antecedentes se puede sugerir que ZmHXK4-8 poseen los residuos necesarios para formar tanto el complejo que lleva a la represión del gen CAB2, así como para inducir la acumulación de antocianinas, mientras que ZmHXK9 solo tiene los primeros. Sin embargo, los mecanismos de señalización por Glu mediados por HXK son tan variados que no es posible

DISCUSIÓN

descartar que, en el caso de maíz, cada una de estas HXKs podría participar en diferentes vías de señalización.

Considerando tanto la función sensor de Glu como la localización celular, en este estudio se encontró que cuatro HXKs mitocondriales y dos citosólicas son proteínas sensores de la abundancia de Glu; sin embargo, en otra monocotiledónea como el arroz, sólo dos mitocondriales y una citosólica fueron identificadas (Cho *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2016). Es probable que debido a que en este trabajo se evaluaron todas las HXKs catalíticamente activas se haya encontrado un número mayor de HXKs con función de sensor de Glu; ya que, en estudios previos en otros organismos, la actividad como sensor de Glu sólo se había evaluado para aquellas proteínas que poseen un elevado porcentaje de similitud con AtHXK1 (Moore *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013, 2016). Las HXKs de maíz descritas en este trabajo podrían tener diversas funciones y por lo tanto una relevancia fisiológica distinta, sin embargo, esto necesita ser determinado.

Finalmente, como ya se mencionó con anterioridad, con el objetivo de generar información acerca de cómo las HXKs de maíz podrían participar en algún evento fisiológico, se evaluaron los perfiles de expresión del mRNA de las HXKs analizadas en este trabajo. Cada una de las HXKs mostró un perfil de expresión diferente, sugiriendo que podría tener diferentes función celular y fisiológica (Fig. 22).

Al inicio de la germinación, la toma de O_2 es baja, en consecuencia, una enzima con una K_m baja por ATP, como ZmHXK7, podría ser de utilidad y conferir ventaja a la célula. Además, se ha demostrado que en arroz, la proteína OsHXK7 es necesaria para completar el proceso de germinación bajo condiciones de hipoxia (Kim *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2016).

En embriones germinados de maíz, es decir en tiempos de imbibición prolongados, la reducción en los lípidos de reserva en el escutelo coincide con la biosíntesis de azúcares (Sánchez-Linares *et al.*, 2012), el uso de estos azúcares puede ser atribuido a las isoformas de HXK que mostraron un perfil de expresión elevado a las 24h como ZmHXK5 y ZmHXK7.

Respecto a las HXKs mitocondriales (ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9), se encontró que en general su expresión fue baja en los embriones de maíz secos, momento en el cual la membrana interna mitocondrial está pobremente desarrollada (Logan *et al.*, 2001) y se espera una cantidad baja de ATP. La demanda metabólica para las HXKs mitocondriales en las

primeras horas de la germinación podría ser baja y cubierta por la actividad de una HXK, ZmHXK4 que en este caso fue la que presentó el mayor grado de expresión durante las primeras horas de imbibición de acuerdo con los resultados obtenidos mediante qPCR (Fig. 22)

La actividad de las HXKs podría ser importante para el metabolismo en general, pero su participación en la vía de señalización por Glu no puede ser excluida. Por ejemplo, en arroz la expresión de la proteína OsHXK6, proteína sensor de Glu (Cho *et al.*, 2009), se incrementa aun cuando su actividad catalítica parece no ser relevante para completar exitosamente el proceso de germinación (He *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2016). La contribución de cada HXK de maíz aquí caracterizada, durante la germinación o cualquier otro proceso de desarrollo y particularmente la de ZmHXK9, requiere ser elucidada en los próximos años.

VIII. CONCLUSIONES.

Las diferencias encontradas entre las HXKs de maíz, ZmHXK4-9, en relación con las características cinéticas, la localización celular, función como sensor de Glu y los niveles de expresión del mRNA durante el proceso de germinación sugieren que cada una de estas proteínas podría tener un papel específico dependiendo de la disponibilidad de carbono, las necesidades metabólicas o el estado de desarrollo de la planta (germinación, establecimiento de la plántula, estado vegetativo, estado reproductor y durante la producción de grano). Se hace necesario realizar más investigaciones para entender el papel fisiológico de cada una de estas proteínas.

IX. PERSPECTIVAS.

- Caracterización bioquímica de las HXKs de maíz presuntamente no catalíticas ZmHXK3ab y ZmHXK10.
- Comprobar si los cambios encontrados en ZmHXK9 son los responsables de la actividad marginal catalítica que presenta.
- Determinar si las versiones catalíticamente inactivas de ZmHXK4-8 también son capaces de reestablecer el fenotipo de insensibilidad a Glu en las mutantes gin 2-1 y la represión de los genes fotosintéticos.
- Determinar con qué otras proteínas interactúan las HXKs de maíz, por ejemplo, RPT5B VHA-B1 y relacionar estas interacciones con su participación en las diferentes vías de señalización.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de las HXKs de maíz en plantas de A. *thaliana* en condiciones de estrés.
- Generar de mutantes de maíz para establecer la relevancia fisiológica de cada una de las HXKs aquí caracterizadas.

X. BIBLIOGRAFÍA.

- Aguilera-Alvarado G.P. (2013). Actividad y expresión de isoformas de hexocinasa de embriones de maíz en respuesta a ABA. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM, CDMX, México.
- Aguilera-Alvarado, G.P., & Sánchez-Nieto, S. (2017). Plant hexokinases are multifaceted proteins. *Plant and Cell Physiology*, 58(7), doi: 10.1093/pcp/pcx062.
- Aguilera-Alvarado, G. P., Guevara-García, Á. A., Estrada-Antolín, S. A., & Sánchez-Nieto, S. (2019). Biochemical properties and subcellular localization of six members of the HXK family in maize and its metabolic contribution to embryo germination. *BMC Plant Biology*, 19(27), doi: 10.1186/s12870-018-1605-x.
- Aki, T., & Yanagisawa, S. (2009). Application of rice nuclear proteome analysis to the identification of evolutionarily conserved and glucose-responsive nuclear proteins. *Journal of Proteome Research*, 8(8), doi: 10.1021/pr900187e.
- Alcántar-Aguirre, F. C., Chagolla, A., Tiessen, A., Délano, J. P., & González de la Vara, L. E. (2013). ATP produced by oxidative phosphorylation is channeled toward hexokinase bound to mitochondrial porin (VDAC) in beetroots (*Beta vulgaris*). *Planta*, 237(6), doi: 10.1007/s00425-013-1866-4.
- Alonso, A. P., Dale, V. L., & Shachar-Hill, Y. (2010). Understanding fatty acid synthesis in developing maize embryos using metabolic flux analysis. *Metabolic Engineering*, 12(5), doi: 10.1016/j.ymben.2010.04.002.
- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., & León, P. (2000). Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. Genes and Development, 14(16), doi: 10.1101/gad.14.16.2085.
- Balasubramanian, R., Karve, A., Kandasamy, M., Meagher, R. B., & Moore, B. d. (2007). A role for F-actin in hexokinase-mediated glucose signaling. *Plant Physiology*, 145(4), doi: 10.1104/pp.107.108704.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 254.
- Bruggeman, Q., Prunier, F., Mazubert, C., de Bont, L., Garmier, M., Lugan, R., Benhamed, M., Bergounioux, C., Raynaud, C., & Delarue, M. (2015). Involvement of Arabidopsis hexokinase1 in cell death mediated by myo -inositol accumulation. *The Plant Cell*, 27(6), doi: 10.1105/tpc.15.00068.
- Camacho-Pereira, J., Meyer, L. E., Machado, L. B., Oliveira, M. F., & Galina, A. (2009). Reactive oxygen species production by potato tuber mitochondria is modulated by mitochondrially bound hexokinase activity. *Plant Physiology*, 149(2), doi: 10.1104/pp.108.129247.
- Cárdenas, M. L., Cornish-Bowden, A., & Ureta, T. (1998). Evolution and regulatory role of the hexokinases. Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research. doi: 10.1016/S0167-4889(97)00150-X.
- Cárdenas, M. L., Rabajille, E., & Niemeyer, H. (1984). Fructose is a good substrate for rat liver "glucokinase" (hexokinase D). The Biochemical Journal, 222 (4).
- Cheng, W., Zhang, H., Zhou, X., Liu, H., Liu, Y., Li, J., Han, S., & Wang, Y. (2011). Subcellular localization of rice hexokinase (OsHXK) family members in the mesophyll protoplasts of tobacco. *Biologia Plantarum*, 55(1), doi: 10.1007/s10535-011-0025-7.
- Cho, J. I.; Ryoo, N.; Hahn, T. R.; Jeon, J. S. (2009). Evidence for a role of hexokinases as conserved glucose sensors in both monocot and dicot plant species. *Plant Signaling & Behavior*, 4(9), doi: 10.1104/pp.108.131227.he.
- Cho, J. I., Ryoo, N., Eom, J., Lee, D.-W., Kim, H., Jeong, S., Lee, Y.-H., Kwon, Y.-K., Cho, M.-H., Bhoo, S. H., Hahn, T.-R., Park, Y.-I., Hwang, I., Sheen, J., & Jeon, J. (2009). Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. *Plant Physiology*, 149(2), doi: 10.1104/pp.108.131227.
- Cho, J. I., Ryoo, N., Ko, S., Lee, S.-K., Lee, J., Jung, K.-H., Lee, Y.-H., Bhoo, S. H., Winderickx, J., An, G., Hahn, T.-R., & Jeon, J.-S. (2006). Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase

gene family in rice (Oryza sativa L.). Planta, 224 (3), doi: 10.1007/s00425-006-0251-y.

- Cho, Y. H., Yoo, S. D., & Sheen, J. (2006). Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127(3), doi: 10.1016/j.cell.2006.09.028.
- Cho, Y., Sheen, J., & Yoo, S. (2010). Low glucose uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from stress and defense hormone abscisic acid and C₂H₄ responses in Arabidopsis. Plant Physiology, 152(3), doi: 10.1104/pp.109.148957.
- Claeyssen, É., & Rivoal, J. (2007). Isozymes of plant hexokinase: Occurrence, properties and functions. *Phytochemistry*, 68 (6), doi: 10.1016/j.phytochem.2006.12.001.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. The Plant Journal, 16(6), doi: 10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x.
- Conde, C., Agasse, A., Glissant, D., Tavares, R., Hernâni, G., & Delrot, S. (2006). Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. *Plant Physiology*, 141(8), doi: 10.1104/pp.106.080804.1.
- Cox, E. L., & Dickinson, D. B. (1973). Hexokinase from maize endosperm and scutellum. Plant Physiology, 51 (3).
- da-Silva, W. S., Rezende, G. L., & Galina, A. (2001). Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *Journal Of Experimental Botany*, *52*(359), doi: 10.1093/jexbot/52.359.1191.
- Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., & Granot, D. (1999). Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *The Plant Cell*, 11(7), doi: 10.1105/tpc.11.7.1253.
- Damari-Weissler, H., Kandel-Kfir, M., Gidoni, D., Mett, A., Belausov, E., & Granot, D. (2006). Evidence for intracellular spatial separation of hexokinases and fructokinases in tomato plants. *Planta*, 224(6), doi: 10.1007/s00425-006-0387-9.
- Doehlert, D. C., Kuo, T. M., & Felker, F. C. (1988). Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize. *Plant Physiology*, 86(4), doi: 10.1104/pp.86.4.1013.
- Duchêne, A., & Giegé, P. (2012). Dual localized mitochondrial and nuclear proteins as gene expression regulators in plants ?, 3(9), doi: 10.3389/fpls.2012.00221.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., & Pikaard, C. S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, 45(4), doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02617.x.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., & Finn, R. D. (2018). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(10), doi: 10.1093/nar/gky995.
- Estrada-Antolín, S. A. (2011). Las isoenzimas de las hexocinasas de maíz en citosol y mitocondria: características de su actividad y su regulación. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, CDMX, México.
- Feng, J., Zhao, S., Chen, X., Wang, W., Dong, W., Chen, J., & Kuang, T. (2015). Biochemical and structural study of Arabidopsis hexokinase 1. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 71 (10), doi: 10.1107/S1399004714026091.
- Galina, A., & Da Silva, W. S. (2000). Hexokinase activity alters sugar-nucleotide formation in maize root homogenates. *Phytochemistry*, 53(1), doi: 10.1016/S0031-9422(99)00456-2.
- Galina, A., Reis, M., Albuquerque, M. C., Puyou, a G., Puyou, M. T., & de Meis, L. (1995). Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *The Biochemical Journal*, 309 (6).
- Giegé, P., Heazlewood, J. L., Roessner-Tunali, U., Millar, A. H., Fernie, A. R., Leaver, C. J., & Sweetlove, L. J. (2003). Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. The Plant Cell, 15(9), doi: 10.1105/tpc.012500.
- Giese, J.-O., Herbers, K., Hoffmann, M., Klösgen, R. B., & Sonnewald, U. (2005). Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from *Nicotiana tabacum*. *FEBS Letters*, 579(3), doi: 10.1016/j.febslet.2004.12.071
- Gietz, D. R. (2014). Chapter 4: Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method. Yeast

Protocols, 163 (1). doi: 10.1007/978-1-4939-0799-1. Springer, N.Y., E.U.A.

- Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), doi: 10.1093/molbev/msp259.
- Graham, I., Denby, K., & Leaver, C. (1994). Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene-expression in Cucumber. *The Plant Cell*, 6(5), doi: 10.1105/tpc.6.5.761.
- Graham, J. W. A., Williams, T. C. R., Morgan, M., Fernie, A. R., Ratcliffe, R. G., & Sweetlove, L. J. (2007). Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *The Plant Cell*, 19(11), doi: 10.1105/tpc.107.053371.
- Granot, D., David-Schwartz, R., & Kelly, G. (2013). Hexose Kinases and Their Role in Sugar-Sensing and Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, 4(March), 44. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00044.
- Gupta, A., Singh, M., & Laxmi, A. (2015). Interaction between glucose and brassinosteroid during regulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 168(5), doi: doi.org/10.1104/pp.114.256313.
- Han, C., & Yang, P. (2015). Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *Proteomics*, 15(10), 1671–1679. https://doi.org/10.1002/pmic.201400375.
- He, D., Han, C., Yao, J., Shen, S., & Yang, P. (2011). Constructing the metabolic and regulatory pathways in germinating rice seeds through proteomic approach. *Proteomics*, 11(13), doi: 10.1002/pmic.201000598.
- Hu, D.-G., Sun, C.-H., Zhang, Q.-Y., An, J.-P., You, C.-X., & Hao, Y.-J. (2016). Glucose sensor MdHXK1 phosphorylates and stabilizes MdbHLH3 to promote anthocyanin biosynthesis in apple. *PLoS Genetics*, 12(8), doi: 10.1371/journal.pgen.1006273.
- Huang, W., Yu, C., Hu, J., Wang, L., Dan, Z., Zhou, W., He, C., Zeng, Y., Yao, G., Qi, J., Zhang, Z., Zhu, R., Chen, X., & Zhu, Y. (2015). Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(48), 14984–9. https://doi.org/10.1073/pnas.1511748112
- Jamsheer K, M., & Laxmi, A. (2015). Expression of Arabidopsis FCS-Like Zinc finger genes is differentially regulated by sugars, cellular energy level, and abiotic stress. Frontiers in Plant Science, 6(9), doi: 10.3389/fpls.2015.00746.
- Jang, J. C., León, P., Zhou, L., & Sheen, J. (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. The Plant Cell, 9(1), doi: 10.1105/tpc.9.1.5.
- Jang, J. C., & Sheen, J. (1994). Sugar sensing in higher-plants. The Plant Cell, 6(11), doi: 10.1105/tpc.6.11.1665.
- Kandel-Kfir, M., Damari-Weissler, H., German, M. A., Gidoni, D., Mett, A., Belausov, E., Petreikov, M.,
- Adir, N., & Granot, D. (2006). Two newly identified membrane-associated and plastidic tomato HXKs: Characteristics, predicted structure and intracellular localization. *Planta*, 224(6), doi: 10.1007/s00425-006-0318-9.
- Kang, S. G., Price, J., Lin, P. C., Hong, J. C., & Jang, J. C. (2010). The Arabidopsis bZIP1 transcription factor is involved in sugar signaling, protein networking, and DNA binding. *Molecular Plant*, 3(2), doi: 10.1093/mp/ssp115.
- Kano, A., Fukumoto, T., Ohtani, K., Yoshihara, A., Ohara, T., Tajima, S., Izumori, K., Tanaka, K., Ohkouchi, T., Ishida, Y., Nishizawa, Y., Ichimura, K., Tada, Y., Gomi, K., & Akimitsu, K. (2013). The rare sugar d-allose acts as a triggering molecule of rice defence via ROS generation. *Journal of Experimental Botany*, 64(16), doi: 10.1093/jxb/ert282.
- Karve, A., & Moore, B. D. (2009). Function of Arabidopsis hexokinase-like1 as a negative regulator of plant growth. *Journal of Experimental Botany*, 60(14), doi: 10.1093/jxb/erp252.
- Karve, A., Rauh, B. L., Xia, X., Kandasamy, M., Meagher, R. B., Sheen, J., & Moore, B. (2008). Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis*. *Planta*, 228(3), doi: 10.1007/s00425-008-0746-9.
- Karve, A., Xia, X., & Moore, B. D. (2012). Arabidopsis Hexokinase-Like1 and Hexokinase1 form a

critical node in mediating plant glucose and ethylene responses. *Plant Physiology*, 158(4), doi: 10.1104/pp.112.195636.

- Karve, R., Lauria, M., Virnig, A., Xia, X., Rauh, B. L., & Moore, B. (2010). Evolutionary lineages and functional diversification of plant hexokinases. *Molecular Plant*, 3(2), doi: 10.1093/mp/ssq003.
- Kelly, G., David-Schwartz, R., Sade, N., Moshelion, M., Levi, A., Alchanatis, V., & Granot, D. (2012). The pitfalls of transgenic selection and new roles of AtHXK1: a high level of AtHXK1 expression uncouples hexokinase1-dependent sugar signaling from exogenous sugar. *Plant Physiology*, 159(1), doi: 10.1104/pp.112.196105.
- Kelly, G., Moshelion, M., David-Schwartz, R., Halperin, O., Wallach, R., Attia, Z., Belausov, E., & Granot, D. (2013). Hexokinase mediates stomatal closure. *The Plant Journal*, 75(6), doi: 10.1111/tpj.12258.
- Kim, H. B., Cho, J. II, Ryoo, N., Shin, D. H., Park, Y. II, Hwang, Y. S., & Jeon, J. S. (2016). Role of rice cytosolic hexokinase OsHXK7 in sugar signaling and metabolism. *Journal of Integrative Plant Biology*, *58*(2), 127–135. https://doi.org/10.1111/jipb.12366
- Kim, M., Lim, J. H., Ahn, C. S., Park, K., Kim, G. T., Kim, W. T., & Pai, H. S. (2006). Mitochondriaassociated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana* benthamiana. The Plant Cell, 18(9), doi: 10.1105/tpc.106.041509.
- Kim, Y. M., Heinzel, N., Giese, J. O., Koeber, J., Melzer, M., Rutten, T., & Hajirezaei, M. R. (2013). A dual role of tobacco hexokinase 1 in primary metabolism and sugar sensing. *Plant, Cell and Environment*, 36(7), doi: 10.1111/pce.12060.
- Koornneef, M., & Smeekens, S. (2005). Sucrose-Specific induction of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis requires the MYB75 / PAP1 gene 1. Plant Physiology, 139(12), doi: 10.1104/pp.105.066688.1840.
- Kuser, P., Cupri, F., Bleicher, L., & Polikarpov, I. (2008). Crystal structure of yeast hexokinase PI in complex with glucose: A classical "induced fit" example revised. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 72(2), doi: 10.1002/prot.21956.
- Kuser, P. R., Krauchenco, S., Antunes, A. C., & Polikarpov, I. (2000). The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(27), doi: 10.1074/jbc.M910412199.
- Lejay, L., Gansel, X., Cerezo, M., Tillard, P., Müller, C., Krapp, A., & Gojon, A. (2003). Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *The Plant Cell*, 15(9), doi: 10.1105/tpc.013516.
- Lejay, L., Wirth, J., Pervent, M., Cross, J. M., Tillard, P., & Gojon, A. (2008). Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiology*, 146(4), doi: 10.1104/pp.107.114710.
- Li, L., & Sheen, J. (2016). Dynamic and diverse sugar signaling. Current Opinion in Plant Biology, 33 (1), doi: 10.1016/j.pbi.2016.06.018.
- Logan, D. C., Millar, A. H., Sweetlove, L. J., Hill, S. A., & Leaver, C. J. (2001). Mitochondrial biogenesis during germination in maize embryos. *Plant Physiology*, 125(2), doi: 10.1104/pp.125.2.662.
- Lugassi, N., Kelly, G., Fidel, L., Yaniv, Y., Attia, Z., Levi, A., & Granot, D. (2015). Expression of *Arabidopsis* hexokinase in *Citrus* guard cells controls stomatal aperture and reduces transpiration. *Frontiers in Plant Science*, 6(12), doi: 10.3389/fpls.2015.01114.
- Matheson, N. K., & Myerst, D. K. (1998). Inhibition of germination by glucose analogues that are hexokinase substrates. *Phytochemistry*, 48(2).
- Miao, H., Cai, C., Wei, J., Huang, J., Chang, J., Qian, H., & Wang, Q. (2016). Glucose enhances indolic glucosinolate biosynthesis without reducing primary sulfur assimilation. *Scientific Reports*, 6(8), doi: 10.1038/srep31854.
- Mishra, B. S., Singh, M., Aggrawal, P., & Laxmi, A. (2009). Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. *PLoS ONE*, 4(2). doi: 10.1371/journal.pone.0004502.
- Monaghan, R. M., & Whitmarsh, A. J. (2015). Mitochondrial proteins moonlighting in the nucleus. *Trends in Biochemical Sciences*, doi: 10.1016/j.tibs.2015.10.003.

- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.-H., Liu, Y.-X., & Sheen, J. (2003). Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300(5617), doi: 10.1126/science.1080585.
- Moreno, F., & Herrero, P. (2002). The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol Rev, 26(1), doi: S0168644501000778 [pii].
- Nilsson, A., Olsson, T., Ulfstedt, M., Thelander, M., & Ronne, H. (2011). Two novel types of hexokinases in the moss *Physcomitrella* patens. *BMC Plant Biology*, *11*(32), doi: 10.1186/1471-2229-11-32.
- Olsson, T., Thelander, M., & Ronne, H. (2003). A novel type of chloroplast dtromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), doi: 10.1074/jbc.M306265200.
- Pego, J. V., & Smeekens, S. C. M. (2000). Plant fructokinases: A sweet family get-together. Trends in Plant Science, 5(12), doi: 10.1016/S1360-1385(00)01783-0.
- Price, J. (2003). Mechanisms of glucose signaling during germination of Arabidopsis. Plant Physiology, 132(3), doi: 10.1104/pp.103.020347.
- Price, J., Laxmi, A., & Jang, J. (2004). Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), doi: 10.1105/tpc.104.022616.involved.
- Ramon, M., Rolland, F., & Sheen, J. (2008). Sugar sensing and signaling. The Arabidopsis Book, 6, doi: 10.1199/tab.0117.
- Randez-Gil, F., Sanz, P., Entian, K. D., & Prieto, J. A. (1998). Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Molecular* and Cellular Biology, 18(5).
- Rawsthorne, S. (2002). Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. Progress in Lipid Research, 41(2), doi: 10.1016/S0163-7827(01)00023-6.
- Reda, M. (2015). Response of nitrate reductase activity and NIA genes expression in roots of Arabidopsis hxk1 mutant treated with selected carbon and nitrogen metabolites. *Plant Science*, doi: 10.1016/j.plantsci.2014.10.008.
- Renz, A., Merlo, L., & Stitt, M. (1993). Partial purification from potato tubers of three fructokinases and three hexokinases which show differing organ and developmental specificity. *Planta*, 190(2), doi: 10.1007/BF00196607.
- Renz, A., & Stitt, M. (1993). Substrate specificity and product inhibition of different forms of fructokinases and hexokinases in developing potato tubers. *Planta*, 190(2), doi: 10.1007/BF00196608.
- Rezende, G. L., Logullo, C., Meyer, L., Machado, L. B., Oliveira-Carvalho, A. L., Zingali, R. B., & Galina, A. (2006). Partial purification of tightly bound mitochondrial hexokinase from maize (Zea mays L.) root membranes. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(9), doi: 10.1590/S0100-879X2006000900003.
- Rognoni, S., Teng, S., Arru, L., Smeekens, S. C. M., & Perata, P. (2007). Sugar effects on early seedling development in Arabidopsis. Plant Growth Regulation, doi:10.1007/s10725-007-9193-z
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, *57*(1), doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441.
- Rottmann, T., Fritz, C., Sauer, N., & Stadler, R. (2018). Glucose uptake via STP transporters inhibits in vitro pollen tube growth in a HEXOKINASE1-dependent manner in Arabidopsis thaliana. Journal of *Experimental Botany*. https://doi.org/10.1105/tpc.18.00356.
- Rottmann, T., Zierer, W., Subert, C., Sauer, N., & Stadler, R. (2016). STP10 encodes a high-affinity monosaccharide transporter and is induced under low-glucose conditions in pollen tubes of *Arabidopsis. Journal of Experimental Botany*, 67(8), doi: 10.1093/jxb/erw048.
- Ryu, J. Y., Jeong, S. W., Kim, S. Y., Ko, Y., Yoon, S., Choi, S. B., & Park, Y. II. (2008). Cyanobacterial glucokinase complements the glucose sensing role of Arabidopsis thaliana hexokinase 1. Biochemical and Biophysical Research Communications, 374(3), doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.041.
- Sánchez-Linares, L., Gavilanes-Ruíz, M., Díaz-Pontones, D., Guzmán-Chávez, F., Calzada-Alejo, V.,

Zurita-Villegas, V., & Sánchez-Nieto, S. (2012). Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), doi: 10.1093/jxb/err313.

- Sarowar, S., Lee, J. Y., Ahn, E. R., & Pai, H. S. (2008). A role of hexokinases in plant resistance to oxidative stress and pathogen infection. *Journal of Plant Biology*, *51*(5), doi: 10.1007/BF03036136.
- Sheen, J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. The Plant Cell, 2(10), doi: 10.1105/tpc.2.10.1027.
- Sheen, J. (2014). Master regulators in plant glucose signaling networks. Journal of Plant Biology, doi: 10.1007/s12374-014-0902-7.
- Srivastava, L. M. (2002). Chapter 19: Seed germination, mobilization of food reserves, and seed dormancy. *Plant Growth and Development*, doi:10.1016/B978-012660570-9/50161-1.
- Sun, J. Y., Chen, Y. M., Wang, Q. M., Chen, J., & Wang, X. C. (2006). Glucose inhibits the expression of triose phosphate/phosphate translocator gene in wheat via hexokinase-dependent mechanism. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(7), doi: 10.1016/j.biocel.2005.11.013.
- Sun, L., Shukair, S., Naik, T. J., Moazed, F., & Ardehali, H. (2008). Glucose phosphorylation and mitochondrial binding are required for the protective effects of hexokinases I and II. *Molecular* and Cellular Biology, 28(3), doi: 10.1128/MCB.00224-07.
- Sun, M., Liao, S., Zhang, L., Wu, C., Qi, N., Lv, M., & Cai, J. (2016). Molecular and biochemical characterization of *Eimeria tenella* hexokinase. *Parasitology Research*, doi: 10.1007/s00436-016-5104-4.
- Sun, M., Ma, Q., Hu, D., Zhu, X., You, C., & Shu, H. (2018). The glucose sensor MdHXK1 phosphorylates a tonoplast Na⁺/ H⁺ exchanger to improve salt tolerance. *Plant Physiology*, 176(4), doi: 10.1104/pp.17.01472.
- Swartzberg, D., Hanael, R., & Granot, D. (2011). Relationship between hexokinase and cytokinin in the regulation of leaf senescence and seed germination. *Plant Biology*, *13*(3), doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00376.x.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), doi: 10.1073/PNAS.76.9.4350.
- Troncoso-Ponce, M. A., Kruger, N. J., Ratcliffe, G., Garcés, R., & Martínez-Force, E. (2009). Characterization of glycolytic initial metabolites and enzyme activities in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Phytochemistry*, *70*(9), doi: 10.1016/j.phytochem.2009.07.012.
- Troncoso-Ponce, M. A., Rivoal, J., Dorion, S., Moisan, M. C., Garcés, R., & Martínez-Force, E. (2011). Cloning, biochemical characterization and expression of a sunflower (Helianthus annuus L.) hexokinase associated with seed storage compounds accumulation. Journal of Plant Physiology, 168(4), doi:10.1016/j.jplph.2010.07.018.
- Veramendi, J., Fernie, A. R., Leisse, A., Willmitzer, L., & Trethewey, R. N. (2002). Potato hexokinase 2 complements transgenic *Arabidopsis* plants deficient in hexokinase 1 but does not play a key role in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Molecular Biology*, 49(5), doi: 10.1023/A:1015528014562.
- Veramendi, J., Roessner, U., Renz, A., Willmitzer, L., & Trethewey, R. N. (1999). Antisense repression of hexokinase 1 leads to an overaccumulation of starch in leaves of transgenic potato plants but not to significant changes in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Physiology*, *121*(9), 123–134. doi: 10.1104/pp.121.1.123.
- Villadsen, D., & Smith, S. M. (2004). Identification of more than 200 glucose-responsive Arabidopsis genes none of which responds to 3-O-methylglucose or 6-deoxyglucose. *Plant Molecular Biology*, *55*(4), doi: 10.1007/s11103-004-1050-0.
- Wang, X. Q., Li, L. M., Yang, P. P., & Gong, C. L. (2014). The role of hexokinases from grape berries (Vitis vinifera L.) in regulating the expression of cell wall invertase and sucrose synthase genes. *Plant Cell Reports*, 4 (17), doi: 10.1007/s00299-013-1533-z.
- Xiao, W., Sheen, J., & Jang, J. C. (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology*, 44(4), doi: 10.1023/A:1026501430422.
- Xiao, Y., Thatcher, S., Wang, M., Wang, T., Beatty, M., Zastrow-Hayes, G., & Yang, X. (2016).

Transcriptome analysis of near-isogenic lines provides molecular insights into starch biosynthesis in maize kernel. *Journal of Integrative Plant Biology*, *58*(8), doi: 10.1111/jipb.12455.

- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., & Sheen, J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496(7444), doi: 10.1038/nature12030.
- Xu, F. Q., Li, X. R., & Ruan, Y. L. (2008). RNAi-mediated suppression of hexokinase gene OsHXK10 in rice leads to non-dehiscent anther and reduction of pollen germination. *Plant Science*, 175(5), doi: 10.1016/j.plantsci.2008.07.002.
- Xu, H. H., Liu, S. J., Song, S. H., Wang, R. X., Wang, W. Q., & Song, S. Q. (2016). Proteomics analysis reveals distinct involvement of embryo and endosperm proteins during seed germination in dormant and non-dormant rice seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 103, doi: 10.1016/j.plaphy.2016.03.007.
- Yanagisawa, S., Yoo, S. D., & Sheen, J. (2003). Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature*, 425(6957), doi: 10.1038/nature01984.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., & Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2(7), doi: 10.1038/nprot.2007.199.
- Yu, F., Li, L. M., Yang, P. P., & Wang, X. Q. (2013). Hexokinase from grape berries: Its prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation and biochemical property analyses. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(3), doi: 10.1007/s13562-012-0163-9.
- Zhang, Y., & He, J. (2015). Sugar-induced plant growth is dependent on brassinosteroids. *Plant Signaling & Behavior*, 2324(9), doi: 10.1080/15592324.2015.1082700.
- Zhang, Z. W., Yuan, S., Xu, F., Yang, H., Zhang, N. H., Cheng, J., & Lin, H. H. (2010). The plastid hexokinase pHXK: A node of convergence for sugar and plastid signals in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 584(16), doi: 10.1016/j.febslet.2010.07.024.
- Zhang, Z., Zhang, J., Chen, Y., Li, R., Wang, H., Ding, L., & Wei, J. (2014). Isolation, structural analysis, and expression characteristics of the maize (Zea mays L.) hexokinase gene family. *Molecular Biology Reports*, 41(9), doi: 10.1007/s11033-014-3495-9.
- Zhao, H., Su, T., Huo, L., Wei, H., Jiang, Y., Xu, L., & Ma, F. (2015). Unreveiling the mechanism of melatonin impacts on maize seedling growth: sugar metabolism as a case. *Journal of Pineal Research*, *5*9(2), doi: 10.1111/jpi.12258.
- Zhong, C., Xu, H., Ye, S., Wang, S., Li, L., Zhang, S., & Wang, X. (2015). Gibberellic acid-stimulated Arabidopsis and aerves as an integrator of Gibberellin, Abscisic Acid, and glucose signaling during seed germination in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 169(3), doi: 10.1104/pp.15.00858.

XI. ANEXOS.

Anexo 1.

Tabla \$11. Números de acceso de los genes de las diferentes familias de HXKs de plantas.

Nombre del gen	Número de acceso
ScHXK1	P048061
ScHXK2	P048071
MpHXK1	Mapoly0022s0069 ²
MpHXK2	Mapoly0056s00081
PpHXK1	Pp3c14_6150 ²
PpHXK2	Pp3c19_20120 ²
PpHXK3	Pp3c21_19280 ²
PpHXK4	Pp3c1 5000 ²
, PpHXK5	Pp3c2 11350 ²
PpHXK6	Pp3c10 8650 ²
PpHXK7	Pp3c22_9450 ²
PpHXK8	Pp3c18 12510 ²
PpHXK9	Pp3c8 18980 ²
PpHXK10	Pp3c23 970 ²
PpHXK11	$Pp3c15 12840^{2}$
SmHXK1	SMO134G0275 ²
SmHXK2	SMO147G0324 ²
SmHXK3	SMO141G0303 ²
SmHXK5	SMO230G0110 ²
HVHXK3	$HVU0038G3254^{2}$
HVHXK5	HVU0036G1776 ²
HVHXK6	HVU0038G0500 ²
HvHXK7	HVU0036G25772
HVHXK8	HVU0038G20592
HVHXK9	HVU0038G2827 ²
HVHXK10	HVU0036G1944 ²
OsHXK1	OS07G0446800 ³
OsHXK2	XP 0156377974
OsHXK3	XP_015621344 ⁴
OsHXK4	XP 0156453164
OsHXK5	$OS05G0522500^3$
OsHXK6	OS01G0742500 ³
OsHXK7	OS05G0187100 ³
OsHXK8	OS01G0190400 ³
OsHXK9	XP 0156147784
OsHXK10	O\$05G0375100 ³
Sphxk1	Sobic.003G035500 ²
SDHXK2	Sobic.003G280400 ²
SDHXK3	Sobic.003G421201 ²
SDHXK5	Sobic.009G203500 ²
SDHXK6	Sobic.003G291800 ²
SDHXK7	Sobic.009G069800 ²
SPHXK10	Sobic.009G119100 ²
ZmHXK3a	GRMZM2G068913 ³
ZmHXK3b	GRMZM2G467069 ³
ZmHXK4	GRMZM2G058745 ³
ZmHXK5	GRMZM2G4328013
ZmHXK6	GRMZM5G856653 ³
ZmHXK7	GRMZM2G0518063
ZmHXK8	GRMZM2G1040813
ZmHXK9	GRMZM2G171373 ³
ZmHXK10	GRMZM2G046686 ³
ТаНХК1	TAE02953G0012

TaHXK2	TAE54883G0012
ТаНХКЗ	TAE52226G0012
TaHXK4	TAF0.5512G002 ²
TaHXK5	TAE56610G00.5 ²
ТаНХКА	TAE57032C0042
	TAE37095C0042
	TAE 47/29/00/42
	TAE4/630G0042
	TAE40692G0042
IAHXKIU	TAE5/619G0012
TaHXKTT	TAE13066G0032
TaHXK12	TAE40850G0022
TaHXK13	TAE40826G003 ²
TaHXK14	TAE19797G0012
TaHXK15	TAE41439G002 ²
TaHXK16	TAE21658G002 ²
TaHXK17	TAE05962G003 ²
TaHXK18	TAE02025G0012
TaHXK19	TAE30281G0012
TaHXK20	TAE51630G0012
TaHYK21	TAE08141C0012
	TAE51140C0012
	TAE52274C0052
	TAE55574G0052
	TAEU8078G0012
TaHXK25	TAE49603G0012
TaHXK26	TAE51566G0022
A†HXK1	AT4G29130 ³
AtHXK2	AT2G19860 ³
A†HXK3	AT1G47840 ³
AtHKL1	AT1G50460 ³
AtHKL2	AT3G200403
AHKL3	AT4G37840 ³
VvHXK1	GSVIVG010152970012
VvHXK2	GSVIVG010169710012
V_{VHXK3}	GSVIVG010098990012
VvHKI 1	GSVIVG010315510012
	GSVIVG010026670012
	Solve02a121070.22
	$Solycosg121070.2^{2}$
	SOIYCU69066440.22
SIHXK3	SOIVCT20008510.12
SIHXK4	Solycu4gu81400.22
SIHXK5	Solyc11g065220.12
SIHXK6	Solyc02g091830.2 ²
MfHXK1	Medfr8g102460 ²
MtHXK2	Medtr6g088795 ²
MtHXK3	Medtr8g014530 ²
MtHXK4	Medtr1g025140 ²
MtHKL1	Medtr5g009000 ²
M†HKL2	Medtr4g097900 ²
StHXK1	PGSC0003DMG4000025252
StHXK2	PGSC0003DMG4000165212
StHXK3	PGSC0003DMG4000002952
StHXKA	PGSC0003DMG4000098412
STHXK5	PGSC0003DMC400007001
0111/1() 0111/1()	PCSC0003DMG40001310/2
JITANO NILUVZI	
	AAS60173'
ΝΤΗΧΚΖ	AA26017/'
NTHXK3	Q6Q8A5'
NtHXK4	AAT775151

NtHXK5	AAS601921
NtHXK6	AAS601941
N†HKL1	AAS601981

Las secuencias de aminoácidos fueron obtenidas de Uniprot¹ (<u>https://www.uniprot.org/uniprot</u>), PLAZA² (<u>https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/</u>), EnsemblPlants³ (<u>http://plants.ensembl.org/index.html</u>) y NCBI⁴ (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</u>).

	Tabla S12.	Porcentaje d	le identidad entre l	os diferentes miembros	de la familia de HXK de maíz
--	------------	--------------	----------------------	------------------------	------------------------------

	ZmHXK3a	ZmHXK3b	ZmHXK4	ZmHXK5	ZmHXK6	ZmHXK7	ZmHXK8	ZmHXK9	ZmHXK10			
Porcentaje de identidad												
ZmHXK3a	100.00	93.57	55.77	55.59	57.18	58.52	56.48	55.45	69.28			
ZmHXK3b	93.57	100.00	55.56	55.52	56.63	58.52	56.77	55.59	69.08			
ZmHXK4	55.77	55.56	100.00	93.24	79.12	63.24	61.48	64.79	52.22			
ZmHXK5	55.59	55.52	93.24	100.00	78.99	61.93	61.53	65.32	51.96			
ZmHXK6	57.18	56.63	79.12	78.99	100.00	63.09	62.74	64.24	52.51			
ZmHXK7	58.52	58.52	63.24	61.93	63.09	100.00	70.76	59.53	52.69			
ZmHXK8	56.48	56.77	61.48	61.53	62.74	70.76	100.00	59.66	53.39			
ZmHXK9	55.45	55.59	64.79	65.32	64.24	59.53	59.66	100.00	53.51			
ZmHXK10	69.28	69.08	52.22	51.96	52.51	52.69	53.39	53.51	100.00			

La matriz fue hecha con Clustal Omega.

Anexo 2.

Tabla \$13. Comparación d	le los aminoácidos en domir	iios conservados y/o reg	giones importantes para	la actividad catalítica e	n HXKs de maíz y AłHXK	l (Karve
et al., 2008).						

Dominio/ Residuo	AtHXK1	ZmHXK3a	ZmHXK3b	ZmHXK4	ZmHXK5	ZmHXK6	ZmHXK7	ZmHXK8	ZmHXK9	ZmHXK10
	Leu 100	<u>lle 100</u>	<u>lle 100</u>	Leu 109	Leu 109	Leu 109	Leu 70	Leu 72	Leu 107	<u>Val 102</u>
	Leu 102	Leu 102	Leu 102	Leu 111	Leu 111	Leu 111	Leu 72	Leu 74	Leu 109	Leu 104
	Leu 143	Leu 141	Leu 141	Leu 152	Leu 152	Leu 152	Leu 113	Leu 115	Leu 150	Leu 144
	lle 147	<u>Val 145</u>	<u>Val 145</u>	lle 156	lle 156	lle 156	lle 117	lle 119	lle 154	lle 148
	Leu 151	Leu 149	Leu 149	Leu 160	Leu 160	Leu 160	Leu 121	Leu 123	Leu 158	Leu 152
Canal hidrofábico	Val 155	Val 153	Val 153	Val 164	Val 164	Val 164	Val 125	Val 127	<u>lle 162</u>	<u>lle 156</u>
	Leu 172	Leu 165	Leu 165	Leu 181	Leu 181	Leu 181	Leu 138	<u>lle 144</u>	Leu 179	Leu 168
	Phe 174	Phe 167	Phe 167	Phe 183	Phe 183	Phe 183	Phe 140	Phe 146	Phe 181	Phe 170
	Phe 176	Phe 169	Phe 169	Phe 185	Phe 185	Phe 185	Phe 141	Phe 148	Phe 183	Phe 172
	Phe 197	Phe 190	Phe 190	Phe 206	Phe 206	Phe 206	Phe 163	Phe 169	Phe 204	Phe 193
	Leu 211	Leu 204	Leu 204	Leu 220	Leu 220	Leu 220	Leu 177	Leu 183	Leu 218	Leu 207
	Leu 215	Leu 208	Leu 208	<u>Met 224</u>	<u>Met 224</u>	<u>Met 224</u>	<u>Met 181</u>	<u>Met 187</u>	<u>lle 222</u>	Leu 211
	Lys 195	Lys 188	Lys 188	Lys 204	Lys 204	Lys 204	Lys 161	Lys 167	Lys 202	Lys 191
Residuos cataliticos	Asp 230	Asp 223	Asp 223	Asp 239	Asp 239	Asp 239	Asp 196	Asp 202	Asp 237	<u>Asn 226</u>
Controlo con Chu	Thr 194	Thr 187	<u>Asn 187</u>	Thr 203	Thr 203	Thr 203	Thr 160	Thr 166	Thr 201	Thr 190
Contacto con GIU	Lys 195	Lys 188	Lys 188	Lys 204	Lys 204	Lys 204	Lys 161	Lys 167	Lys 202	Lys 191

	Asn 229	Asn 222	Asn 222	Asn 238	Asn 238	Asn 238	Asn 195	Asn 201	Asn 235	Asn 225
	Asp 230	Asp 223	Asp 223	Asp 239	Asp 239	Asp 239	Asp 196	Asp 202	Asp 236	<u>Asn 226</u>
	Ser 177	Ser 170	Ser 170	Ser 186	Ser 186	Ser 186	Ser 143	Ser 149	Ser 184	Ser 173
	Asn 256	Asn 249	Asn 249	Asn 265	Asn 265	Asn 265	Asn 222	Asn 228	Asn 263	Asn 252
	Glu 284	Glu 277	Glu 277	Glu 293	Glu 293	Glu 293	Glu 253	Glu 256	Glu 291	Glu 281
	Glu 315	Glu 308	Glu 308	Glu 324	Glu 324	Glu 324	Glu 284	Glu 287	Glu 322	Glu 312
	Gly 104	Gly 104	Gly 104	Gly 113	Gly 113	Gly 113	Gly 74	Gly 76	Gly 111	Gly 106
	Thr 105	Thr 105	Thr 105	Thr 114	Thr 114	Thr 114	Thr 75	Thr 77	Thr 112	Thr 107
	Asn 106	Asn 106	Asn 106	Asn 114	Asn 114	Asn 114	Asn 76	Asn 78	Asn 113	<u>Ser 108</u>
	Ser 177	Ser 170	Ser 170	Ser 186	Ser 186	Ser 186	Ser 143	Ser 149	Ser 184	Ser 173
	Lys 195	Lys 188	Lys 188	Lys 204	Lys 204	Lys 204	Lys 161	Lys 167	Lys 202	Lys 191
Interacciones con ATP	Asp 230	Asp 223	Asp 223	Asp 239	Asp 239	Asp 239	Asp 196	Asp 202	Asp 236	<u>Asn 226</u>
Interacciones con ATP	Thr 253	<u>Ala 246</u>	<u>Ala 246</u>	Thr 262	Thr 262	Thr 262	Thr 219	Thr 225	Thr 260	<u>Ala 249</u>
	Gly 254	Gly 247	Gly 247	Gly 263	Gly 263	Gly 263	Gly 220	Gly 226	Gly 261	Gly 250
	Asp 439	<u>Glu 438</u>	<u>Glu 438</u>	Asp 450	Asp 450	Asp 449	Asp 406	Asp 409	Asp 445	<u>Glu 444</u>
	Gly 440	Gly 439	Gly 439	Gly 451	Gly 451	Gly 450	Gly 407	Gly 410	Gly 446	Gly 445
	Gly 441	Gly 440	Gly 440	Gly 452	Gly 452	Gly 451	Gly 408	Gly 411	Gly 447	Gly 446
	Ser 478	Ser 477	Ser 477	Ser 489	Ser 489	Ser 486	Ser 445	Ser 448	Ser 484	Ser 483
Gly conservadas	Gly 91	Gly 91	Gly 91	Gly 100	Gly 100	Gly 100	Gly 61	Gly 63	Gly 98	Gly 93

Gly 95	Gly 95	Gly 95	Gly 104	Gly 104	Gly 104	Gly 65	Gly 67	Gly 102	Gly 97
Gly 103	Gly 103	Gly 103	Gly 112	Gly 112	Gly 112	Gly 73	Gly 75	Gly 110	Gly 105
Gly 173	Gly 166	Gly 166	Gly 182	Gly 182	Gly 182	Gly 139	Gly 145	Gly 180	Gly 169
Gly 252	Gly 245	Gly 245	Gly 261	Gly 261	Gly 261	Gly 218	Gly 224	Gly 259	Gly 248
Gly 254	Gly 247	Gly 247	Gly 263	Gly 263	Gly 263	Gly 220	Gly 226	Gly 261	Gly 250
Gly 310	<u>Asn 303</u>	<u>Asn 303</u>	Gly 319	Gly 319	Gly 319	Gly 279	Gly 282	<u>Asp 317</u>	<u>Tyr 307</u>
Gly 320	Gly 313	Gly 313	Gly 329	Gly 329	Gly 329	Gly 289	Gly 292	Gly 327	Gly 317
Gly 440	Gly 439	Gly 439	Gly 451	Gly 451	Gly 450	Gly 407	Gly 410	Gly 446	Gly 445
Gly 479	Gly 478	Gly 478	Gly 490	Gly 490	Gly 489	Gly 446	Gly 449	Gly 485	<u>Val 484</u>

Los cambios en los aminoácidos se muestran en negritas y subrayados. Los números indican la posición del aminoácido.

Anexo 3.



								1200	
AtHXK1	VTHSN	DGSGIGAALL	AASHSL	FYALDLGGT	NFRVMRVLLG	GKQ	AV	ILGTGTNAAY	VER
AtHXK2	VILSN	DGSGVGAALL	AASHSQ	FYALDLGGT	NFRVMRVLLG	GKH	AV	ILGTGTNAAY	VER
AtHXK3	IKHTK	DVSGLGAALL	AATNSI	FYALDL GGT	NFRVRSVQLG	GKK	GV	ILGTGTNACY	VEQ
AtHKL1	VKAME	DGSSIGSALL	VASLQS	YYALHLGGT	YFRILRVLLG	DOR	AV	VFGTGSNACY	LER
AtHKL2	VKAME	DGSSIGSALL	LASSQS	YYALHLGGS	YFRIIKVHLG	GOR	AV	VFGTGSNACY	LER
AtHKL3	IEHSH	GGSAAGALFL	AACGDG	HYGVNLRGK	ELLLLRGTLG	GNE	AV	SLGMGTNAAY	IEQ
OsHXK1	VKLAS	DGSGLGAALV	AAAHSQ	YYALDLGGT	NFRVLRVRLA	GGG	AV	ILGTGTNAAY	VEDA
OsHXK2	IKLAK	DG <mark>S</mark> GIGAALL	AAAHSQ	FYALDL GGT	NFRVLRVQLG	GKE	AV	ILGTGTNAAY	VER
OsHXK3	LRVTE	DGSGVGAALL	AAVHSS	YYSIDL GGT	NFRVLRVQVG	AG-	AV	IIGSGTNACY	IER
OsHXK4	IEHTK	DGSGIGAALL	AAANSK	FYALDLGGT	NFRVLRVQLG	GKD	AV	ILGTGTNACY	IOR
OsHXK5	TKLAN	DGSGIGAALL	AASHSQ	FYALDLGGT	NFRVLRVQLG	GKE	AI	ILGTGTNAAY	VEN
OsHXK6	VKLAN	DGSGIGAALL	AASHSQ	FYALDLGGT	NFRVIRVQLG	GRE	AV	ILGTGTNAAY	VEHA
OsHXK7				FYAL <mark>DL</mark> GGT	NFRVLRVQLA	GKE	GV	ILGTGSNAAY	LEK
OsHXK8	VKHAN	DGSGIGAALI	AASQSR	FYGLDLGGT	NFRVLKVHLG	GSK	GV	IFGTGTNAAY	VEK
OsHXK9	IKHVN	DGSGVGAALL	AASYSQ	FYALDLGGT	NFRVLRVQLG	GKE	AV	ILGTGSNAAY	IDH
OsHXK10	LRVME	EGSGTGAALL	AAAYSS	SYAIDLGGT	SFRVLKVELG	AG-	AV	IIGAGTNACY	IER
ZmHXK3a	LEVTV	DGSGAGAALL	AAVHSS	YYSIDL GGT	NFRVLKVEVG	DG-	AV	IIGAGTNACY	IER
ZmHXK3b	LRVTV	DGSGAGAALL	AAVHSS	YYSIDLGGT	NFRVLRVEVG	AG-	AV	IIGAGTNACY	IER
ZmHXK4	AKLAN	DGSGIGAALL	AASHSQ	FYALDL GGT	NFRVLRVQLG	GKE	AV	ILGTGTNAAY	VEH
ZmHXK5	AKLAN	DGSGIGAALL	AASHSQ	FYALDL GGT	NFRVLRVKLG	GRE	AV	ILGTGTNAAY	VEH
ZmHXK6	VKLAN	DGSGIGAALL	AASHSQ	FYALDL GGT	NFRVIRVQLG	GRD	AV	ILGTGTNAAY	VEH
ZmHXK7	VKLTK	DGSGLGAALI	AAAHSQ	FYALDLGGT	NFRVLRVQLA	GKD	GV	ILGTGSNAAY	VEE
ZmHXK8	IKHAD	DGSGIGAALI	AASQSQ	FYGLDLGGT	NFRVLKVQLG	GNA	GV	IFGTGTNAAY	VEK
ZmHXK9	IKLAE	DGSGTGAALL	SASYSQ	FYALDL GGT	NFRVLRIQFG	GKE	AV	ILGTGTNAAY	IEHI
ZmHXK10	LRVME	DGSVIGAALV	AASYSS	YYSVDLGGT	SFRVMKLELG	PG-	AV	VIGAGTNASY	IER

ANEXOS



Fig. S23. Alineamiento múltiple de secuencias de los dominios conservados e importantes para la catálisis en las HXKs de A. thaliana, arroz y maíz.

Las secuencias fueron alineadas con el software SeaView 4 (Gouy *et al.*, 2010). Los sitios involucrados en la catálisis y en la unión a los sustratos fueron identificados por inspección. La flecha roja indica el residuo de Pro que es diferente en ZmHXK9 y otras HXKs sin actividad catalítica.

Anexo 4.



Péptido hidrofóbico

Fig. S24. Análisis de las secuencias del extremo N-terminal de las diferentes familias de HXKs de A. thaliana, arroz y maíz.

El análisis de secuencias fue hecho por inspección visual con ayuda del software SeaView 4 (Gouy, Guindon & Gascuel, 2010). La predicción de la secuencia que funciona como péptido de anclaje en la membrana fue hecha con el software Toppred 1.10. Dicho péptido es altamente hidrofóbico (región sombreada), tiene una longitud de aproximadamente 24 aminoácidos y está altamente conservado en otras HXKs tipo B como por ejemplo AtHXK1, AtHXK2, OsHXK5 y OsHXK6.



Fig. S25. Curvas de saturación de la actividad de ZmHXK4Δ30-6Δ30 and ZmHXK9Δ30 con Fru, Man y ATP como sustratos.

El efecto de Fru (A, D, G, J) y Man (B, E, H, K) sobre la actividad de HXK fue determinado en un medio de reacción que contenía 2 mM ATP. Para determinar el valor de Km por ATP (C, F, I, L) se añadió 5 mM Glu al medio de reacción. Actividad de A, B, C) ZmHXKA4; D, E, F) ZmHXKA5; G, H, I) ZmHXKA6 y J, K, L) ZmHXKA9. Los puntos graficados representan la media y la desviación estándar de seis réplicas independientes.



Fig. S26. Curvas de saturación de la actividad de ZmHXK7-8 con Fru, Man y ATP como sustratos.

El efecto de Fru (A, D) y Man (B, E) sobre la actividad de HXK fue determinado en un medio de reacción que contenía 2 mM ATP. Para determinar el valor de K_m por ATP (C, F) se añadió 5 mM Glu para ZmHXK7 y 50 mM Glu para ZmHXK8 al medio de reacción. Actividad de A, B, C) ZmHXK7 y D, E, F) ZmHXK8. Los puntos graficados representan la media y la desviación estándar de seis réplicas independientes.



Los efectos inhibitorios de ADF, NAG y Gor sobre la actividad de las NAKS de Maiz. Los efectos inhibitorios fueron determinados con 5 mM Glu o 50 mM Glu (ZmHXK8) y 2 mM ATP. G6P no tuvo un efecto significativo sobre ZmHXK7 (L) y ZmHXK8 (O) aún en concentraciones elevadas. Actividad de A, B, C) ZmHXK4Δ30; D, E, F) ZmHXK5Δ30; G, H, I) ZmHXK6Δ30; J, K, L) ZmHXK7 y M, N, O) ZmHXK8. Los puntos graficados representan la media y la desviación estándar de seis réplicas independientes.

Anexo 6.



Fig. S28. Perfiles de expresión de las diferentes HXKs de maíz truncas y completas en las cepas transformantes de la cepa de levadura JT 20088.

El tamaño esperado de cada uno de los productos fue de ZmHXK4: 480 pb; ZmHXK5: 480 pb; ZmHXK6: 147 pb; ZmHXK7: 130 pb; ZmHXK8: 180 pb y ZmHXK9: 137 pb. St: Marcador de peso molecular. Imágenes representativas de dos réplicas independientes.

Anexo 7.



93

ANEXOS



Fig. S29. Localización subcelular de las HXKs de maíz.

Para determinar la localización subcelular de las diferentes HXKs de maíz fusionadas a GFP por el extremo C-terminal, se llevó a cabo un ensayo de expresión transitoria en protoplastos de A. *thaliana*. Ninguna de las HXKs de maíz se localizó en el cloroplasto. En la figura se muestran las proyecciones en Z de las imágenes obtenidas con el microscopio confocal de protoplastos de A. *thaliana* A) Sin transformar, B) Transformados con el vector vacío pEarleyGate103, C) Expresando GFP y las versiones completas de D) ZmHXK4, E) ZmHXK5, F) ZmHXK6, G) ZmHXK7, H) ZmHXK8 e I) ZmHXK9. La autofluorescencia de la clorofila se utilizó como marcador de localización cloroplástica y se muestra en azul. Imágenes representativas de al menos cuatro réplicas independientes.

ANEXOS





Fig. S30. Porcentaje de plántulas establecidas en agar suplementado con Glu al 2%.

Sólo las mutantes de A. *thaliana gin2-1* y las plántulas expresando a ZmHXK9 fueron capaces de establecerse en el medio debido a su insensibilidad a Glu. Para determinar la sensibilidad de Glu en una población de plantas, se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los valores representados en las gráficas son las medias y DE (desviaciones estándar) de dos réplicas biológicas. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a las plántulas silvestres en concentración elevada de Glu (2%, Prueba de Tukey, p < 0.05). Por cada réplica se utilizaron al menos 50 plantas de cada línea.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Biochemical properties and subcellular localization of six members of the HXK family in maize and its metabolic contribution to embryo germination

Giovanna Paulina Aguilera-Alvarado¹, Ángel Arturo Guevara-García², Samuel Abraham Estrada-Antolín¹ and Sobeida Sánchez-Nieto^{1*}

Abstract

Background: Seed germination is a crucial process in the plant life cycle when a dramatic variation of type and sugar content occurs just as the seed is hydrated. The production of hexose 6 phosphate is a key node in different pathways that are required for a successful germination. Hexokinase (HXK) is the only plant enzyme that phosphorylates glucose (Glc), so it is key to fueling several metabolic pathways depending on their substrate specificity, metabolite regulatory responses and subcellular localization. In maize, the HXK family is composed of nine genes, but only six of them (ZmHXK4–9) putatively encode catalytically active enzymes. Here, we cloned and functionally characterized putative catalytic enzymes to analyze their metabolic contribution during germination process.

Results: From the six HXKs analyzed here, only ZmHXK9 has minimal hexose phosphorylating activity even though enzymatic function of all isoforms (ZmHXK4–9) was confirmed using a yeast complementation approach. The kinetic parameters of recombinant proteins showed that ZmHXK4–7 have high catalytic efficiency for Glc, fructose (Fru) and mannose (Man), ZmHXK7 has a lower Km for ATP, and together with ZmHXK8 they have lower sensitivity to inhibition by ADP, G6P and N-acetylglucosamine than ZmHXK4–6 and ZmHXK9. Additionally, we demonstrated that ZmHXK4–6 and ZmHXK9 are located in the mitochondria and their location relies on the first 30 amino acids of the N-terminal domain. Otherwise, ZmHXK7–8 are constitutively located in the cytosol. HXK activity was detected in cytosolic and mitochondrial fractions and high Glc and Fru phosphorylating activities were found in imbibed embryos.

Conclusions: Considering the biochemical characteristics, location and the expression of ZmHXK4 at onset of germination, we suggest that it is the main contributor to mitochondrial activity at early germination times, at 24 h other ZmHXKs also contribute to the total activity. While in the cytosol, ZmHXK7 could be responsible for the activity at the onset of germination, although later, ZmHXK8 also contributes to the total HXK activity. Our observations suggest that the HXKs may be redundant proteins with specific roles depending on carbon and ATP availability, metabolic needs, or sensor requirements. Further investigation is necessary to understand their specific or redundant physiological roles.

Keywords: Hexokinase, Maize, Germination, Biochemical characterization, Cytosolic HXK, Mitochondrial hexokinase

* Correspondence: sobeida@unam.mx

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Conjunto E., Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, Mexico Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Seed germination, which starts with the imbibition, is a crucial event in the plant life cycle when metabolic activity resumes, and reserves are mobilized to support initial plant development. These are key steps to sustain the seedling growth before photosynthetic machinery lights up [1]. After germination, high content of hexoses 6 phosphate was detected in wild oat, Arabidopsis and rice seeds [2, 3], which indicates the activation of metabolism. Soluble sugars support the metabolic activity at the onset of germination, followed by the massive degradation of starch reserves and even the components of the cell wall at later times [1, 2, 4, 5]. Sugars are the main source of carbon and energy, but they also have signaling functions [6]. Therefore, the dramatic changes of sugar type and concentration during the germination process undoubtedly regulates the enzyme activity and the pattern of gene expression of several enzymes [5, 6].

Hexokinase (HXK) is a glycolytic regulatory enzyme that catalyzes the irreversible phosphorylation reaction of D-hexoses at the sixth carbon using ATP-Mg²⁺ as a phosphate donor. The HXK family members, that can phosphorylate several hexoses, including glucose (Glc), mannose (Man) and fructose (Fru) [7], can be localized at cytosol, mitochondria, nucleus or chloroplast depending of the presence of an anchor or signal peptide at their N-terminal sequence [8, 9]. The metabolic flux of substrates through different pathways, like the tricarboxylic acid cycle (TCA), oxidative pentose phosphate pathway (OPPP), the fatty acid synthesis and nucleoside diphosphate sugar biosynthesis, depends on the localization of the HXK's metabolic products and other downstream metabolic intermediates [7, 9, 10]. Furthermore, inhibition of germination in fenugreek, mung beans, white mustard and wheat seeds, was detected with HXK substrates like 2-deoxyglucose, D-mannose (Man), and D-glucosamine [11]. This, along with the low rate of germination of oshxk7 null mutants under O2-deficient conditions [12], reveals the key role that HXK has in providing energy and carbon skeletons to different pathways during this demanding process. Therefore, the expression of different HXKs at specific times and subcellular locations may contribute to control the metabolic flux during the germination.

Regardless of its catalytic function, a substantial amount of research demonstrated that HXKs function as Glc sensors in plants. For example, in response to Glc abundance, HXK promotes the suppression of some photosynthetic genes, including the rubisco small subunit, carbonic anhydrase, sedoheptulose bisphosphatase, and the chlorophyll a/b-binding protein [13–16]. Although HXKs are the only enzymes that phosphorylate Glc in plants [7], their catalytic activity has received less attention than their Glc sensor function [8]. Only a few HXKs has been characterized so far, some of them in subcellular fractions that could very well contain several HXKs [17–24]. We believe that due to its potential to eventually manipulate plant productivity, the study of hexokinase deserves much more attention. Unfortunately, the study of HXK families particularly in important crops is incipient in many ways.

In maize the HXK family is composed of nine genes. Six of them (ZmHXK4-9) putatively encode catalytically active HXKs. The other three (ZmHXK3a, ZmHXK3b and ZmHXK10), according to their sequence homology, encode proteins structurally similar to HXKs, but lacking catalytic activity, they are called HXK-like (HXL) [25, 26]. HXK activity has been detected in cytosolic, mitochondrial and Golgi membrane fractions of maize roots [21, 27, 28]. However, based in gene sequence analysis has been suggested that maize HXKs might be located in the cytosol, mitochondria and chloroplast membranes [25, 26]. Thus, we understand that the subcellular location and the number of enzymes that contribute to the total hexokinase activity in each cell compartment require clarification. Then the contribution each maize HXKs during a particular physiological process could be addressed. Elucidate the participation of a protein in any metabolic or developmental processes is difficult when mutants are not available. However, we hypothesize that the possible contribution of the six putative catalytic maize HXKs during the germination process, could be studied comparing their expression patterns, their catalytic parameters and they subcellular location. Besides, our study provides detailed molecular information on six HXKs that differentiate themselves by substrate specificity, metabolite regulatory responses and subcellular localization. This information helps us to understand how different HXKs could be involved in a physiological process like maize seed germination.

Results

Identifying the maize HXK family members that have catalytic activity by in silico analysis

To study the HXK maize isoenzymes that contribute to the metabolism on the germination process, and their evolutionary relationships between HXK protein families, 112 HXKs plant protein sequences were aligned using MEGA X [29]. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model [30, 31] using 2000 bootstrap. The phylogenetic analysis included two yeast HXKs sequences as an out-group (see Additional file 1: Figure S1 and Table S1). Since some HXKs are already characterized, we found that the HXKs were clustered according to some specific characteristics such as subcellular localization or lack of HXK activity. The maize HXKs were found in three clusters in the cladogram? tree, ZmHXK7 and ZmHXK8 are related to the monocot HXKs, such as OsHXK7 and OsHXK8 [12, 25, 32, 35]. Apparently, the mitochondrial HXKs are grouped in three subgroups: one mitochondrial HXKs in dicot plants, and two subgroups of HXKs in monocots, in the latter we found four ZmHXKs; ZmHXK4, 5 and 6 are in a subgroup different to the subgroup in which ZmHXK9 is. ZmHXK3a, ZmHXK3b, and ZmHXK10 are in the Hexokinase-like (HKL) group.

The protein sequences of Zea mays, A. thaliana and Oryza sativa were further analyzed trying to visualize the amino acid differences between the putative HXK and HKL. The sequences were aligned using SeaView 4 [33] and information related to the tridimensional structure of AtHXK1 was used in the sequence analysis [20, 32]. A high degree of amino acid conservation in the putative domains, regions and conserved amino acids involved in binding substrates was identified in ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6, ZmHXK7, ZmHXK8 and ZmHXK9 (Fig. 1, see Additional file 1: Table S2). In contrast, ZmHXK3a, ZmHXK3b and ZmHXK10, have several differences in the domains and residues that are involved in substrate binding in loop 2 and adenosine binding domain (Fig. 1, see Additional file 1: Table S2). All these modifications are also found in A. thaliana and rice HKL proteins, which lack catalytic activity [25, 32], suggesting that ZmHXK3a, ZmHXK3b and ZmHXK10 are mostly likely HKL. Since the main goal of this work was to characterize the members of the HXK family in maize contributing to the seed germination metabolism, we focus on to clone the open reading frames (ORFs) of ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6, ZmHXK7, ZmHXK8 and ZmHXK9, and they were analyzed further.

In vitro kinetic characterization of maize HXKs

To evaluate and characterize the activity of maize HXK isoenzymes the cognate ORFs were cloned and, recombinant proteins were produced in bacteria (Fig. 2a, see Additional file 1: Figure S2). ZmHXK7 and ZmHXK8 are soluble proteins, and their kinetic parameters were directly determined. ZmHXK4-6 proteins were found in the pellet and ZmHXK9 was not produced in E. coli. Insoluble ZmHXK4-6 proteins were detergent solubilized and renatured, but the enzymes recovered from this process did not show HXK activity. Since some HXKs have a hydrophobic peptide that could make the enzymes insoluble, a new version of each protein was made deleting the first 30 amino acids to exclude the highly hydrophobic sequence (Fig. 2b-c). When expressed in E. coli, these truncated variants of ZmHXK4A30, ZmHXK5A30, ZmHXK6A30, and ZmHXK9∆30, were recovered and purified from the supernatant (Fig. 2c, see Additional file 1: Figure S3), then used to determine their kinetic parameters.

ZmHXK9 Δ 30 was the only protein that had minimal hexose phosphorylating activity, close to the blank, even in

presence of high concentrations of each substrate, or 4 times more protein than the used to determine the activity of other HXKs, therefore the kinetic parameters were not obtained for this protein. The activity data for ZmHXK4–8 were adjusted to Michaelis–Menten kinetics for the three assayed hexoses and ATP (Figs. 3 and 4). The kinetic parameters were calculated by a non-linear regression fit (Table 1). The substrate preferences for all the maize HXKs were similar, especially for ZmHXK4 Δ 30-ZmHXK6 Δ 30. They had a smaller $K_{\rm m}$ value for Man followed by the Glc $K_{\rm m}$ value, but the lower $V_{\rm max}$ found was displayed for Man.

The enzyme with the smallest $K_{\rm m}$ for Glc was ZmHXK6 Δ 30. Moreover, ZmHXK7 had the smallest $K_{\rm m}$ for ATP and Fru, as opposed to ZmHXK8, for which it was not possible to estimate the $K_{\rm m}$ for Fru, because the enzyme did not reach saturation for this substrate (Fig. 4). ZmHXK8 had the largest $K_{\rm m}$ for Glc and Man compared to the other HXKs (Table 1).

Both products of the HXK reaction, ADP and G6P, modulate the HXK activity. It was found that ZmHXK7 and ZmHXK8 were less sensitive to ADP and G6P inhibition than ZmHXK4 Δ 30-6 Δ 30 (Table 2, Additional file 1: Fig. S4). ADP and N-acetyl-glucosamine (NAG), produced strong inhibition of the mitochondrial HXK activity in maize roots but did not alter the cytosolic activity [21, 27, 34], suggesting that ZmHXK4 Δ 30-6 Δ 30 are mitochondrial enzymes.

The putative maize HXKs are functional enzymes

A yeast complementation assay was used to verify the enzymatic activity of ZmHXK4-9 (without any tag) in vivo. For this assay, we used the JT 20088 mutant of S. cerevisiae that has disrupted hxk1, hxk2 and glk1 genes and it cannot use Glc and Fru as carbon sources (galactose was used as the carbon source). Only ZmHXK9 could not complement the yeast mutant, suggesting its lack of HXK activity or poor recombinant protein expression, however a PCR reaction to determine the expression profile of each HXK in the yeast mutant showed a low expression of ZmHXK9 (Additional file 1: Figure S5). Conversely, yeast growth was possible in Glc and Fru supplemented media for cells transformed with the ZmHXK4-8 genes, although some differences were found (Fig. 5a). The yeast carrying full versions of the ZmHXK5 and ZmHXK6 genes grew slower in Glc medium than carrying the ZmHXK4 gene. In E. coli ZmHXK4 Δ 30-6 Δ 30 have almost similar K_m among them (Table 1), we speculate that in the full versions the N-terminal domain could have a negative effect on the enzyme activity when expressed in yeast, as full version proteins are insoluble in E. coli and in the case of ZmHXK9 the sequence of the N-terminal could affect the transcript level. To explore these possibilities, a yeast complementation assay was performed with ZmHXK4A30-6A30 and ZmHXK9 Δ 30. All yeast transformed with the truncated





maize HXK versions have a high level of ZmHXK expression even in ZmHXK9 Δ 30 (see Additional file 1: Figure S5). Yeast mutant expressing ZmHXK4 Δ 30 and ZmHXK6 Δ 30 grew better than those that expressed the full versions (Fig. 5b), even ZmHXK9 Δ 30 complemented the yeast mutant. All together, these results show that the six maize HXKs analyzed here are functional enzymes and support the idea that the N-terminal domain affects the enzymatic activity in yeast at least for ZmHXK5 and ZmHXK6 (Fig. 2c). In the case of ZmHXK9 the N-terminal affects its transcription in the mutant yeast.

Prediction of the subcellular localization

A different subcellular localization was proposed for the maize HXKs. According to the cladogram tree, the maize HXKs are predicted to be at the mitochondria and cytosol (see Additional file 1: Figure S1). Since the subcellular localization of an enzyme is determinant for

its physiological function, we identified the amino acid sequence using the TargetP 1.1 server [32] that predicts the localization of active HXK members in maize. ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6, and ZmHXK9 have a large hydrophobic domain (Fig. 2c) and is predicted to be a transmembrane domain which is could be used to secrete the protein (Addtional file 1: Table S3). Proteins with similar helical domains that attach proteins to the outer mitochondrial membrane were found in AtHXK1, AtHXK2, OsHXK5, and OsHXK6 (Fig. 2c) [33, 36-40], suggesting that ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6, and ZmHXK9 are outer mitochondrial membrane proteins. By contrast, ZmHXK7 and ZmHXK8 do not have sequences that could act as transit peptides or transmembrane domains (Fig. 2c and Additional file 1: Table S3). Similar results were obtained for the cytosolic HXKs of rice, OsHXK7 and OsHXK8 [12, 37], suggesting that ZmHXK7 and ZmHXK8 could be in the cytosol. This is



possible even if the TargetP 1.1 software [35] predicted that ZmHXK8 was located at the chloroplast.

Expression of maize active HXKs fused to green fluorescent protein (GFP)

To establish the intracellular localization of the maize HXKs, a transient expression system using *A. thaliana* protoplasts transformed with ZmHXK4–9:GFP fusion proteins was analyzed. As reference of mitochondrial localization, Mitotracker dye staining intact mitochondria was monitored. GFP fluorescence from ZmHXK4:GFP, ZmHXK5:GFP, ZmHXK6:GFP, and ZmHXK9:GFP co-localized with the orange Mitotracker signal (Fig. 6a-d), similar to AtHXK1-GFP (Fig. 6g) indicating that these proteins are target to mitochondria. ZmHXK7:GFP and ZmHXK8:GFP apparently accumulate in

the cytoplasm (Fig. 6e-f), similar to the fluorescence observed with the GFP alone (Fig. 6h).

The N-terminus directs the protein to the mitochondria

The mitochondrial localization could be mediated by an anchor peptide present at the amino-terminal sequence. Taking advantage of having full and truncated versions of these HXKs, it was possible to investigate the function of this putative membrane anchor peptide. As ZmHXK4 Δ 30:GFP, ZmHXK5 Δ 30:GFP, ZmHXK6 Δ 30:GFP, and ZmHXK9 Δ 30:GFP changed their localization from the mitochondria to the cytosol, we concluded that their 30 N-terminal amino acids represent functional mitochondrial anchor sequences to the mitochondria membrane (Fig. 7a-d).



Fig. 3 Saturation curves of HXK activity of ZmHXK4 Δ 30, ZmHXK5 Δ 30 and ZmHXK6 Δ 30 for glucose, fructose, mannose and ATP. HXK activity of maize isoenzymes was determined for the recombinant truncated versions: **a**, **b**, **c**, **d** ZmHXK4 Δ 30, (**e**, **f**, **g**, **h**) ZmHXK5 Δ 30, (**i**, **j**, **k**, **l**) ZmHXK6 Δ 30. The reaction medium contained 2.5 µg of purified recombinant protein. The effect of increasing concentrations of Glc (**a**, **e**, **i**), Fru (**b**, **f**, **j**) and Man (**c**, **g**, **k**) was determined with a fixed concentration of 2 mM ATP. To determine the Km for ATP (**d**, **h**, **l**) 5 mM Glc was included in the reaction medium. The data was adjusted to Michaelis-Menten equation. The graphics were obtained with the Origin 8.0 software. Values represent the average ± standard deviation of two technical repeats from three independent replicates

HXK activity in different maize tissues

As a first approximation to analyze the contribution of the HXKs to metabolism, we explored the HXK activity in different tissues of a mature plant and 24 h imbibed embryos. The embryo was chosen instead of the seed due to the low contribution of the endosperm storage reserves at the onset of the germination, and that the removal of the endosperm does not affect the germination [1, 4]. Cytosolic and mitochondrial fractions were obtained, and the quality of each fraction was assay [0]

Page 7 of 18 ANEXOS


Protein	Parameter ^a	Substrate						
		Glucose	Fructose	Mannose	ATP			
ZmHXK4A30	V _{max}	5.65 ± 0.12	3.05 ± 0.46	3.23 ± 0.22	1.83 ± 0.35			
	Km	195.70 ± 31.96	19,324.15 ± 3914.89	138.85 ± 22.42	134.90 ± 25.74			
	k _{cat} /K _m	2.85×10^{4}	1.55×10^{2}	2.29 × 10 ⁴	1.34 × 10 ⁴			
ZmHXK5 <mark>A</mark> 30	V _{max}	4.55 ± 0.34	2.49 ± 0.29	2.77 ± 0.19	1.54 ± 0.56			
	Km	136.65 ± 20.01	30,216.8. ± 5708.76	119.55 ± 33.30	135.60 ± 11.46			
	k _{cat} /K _m	3.27×10^{4}	81.00	2.28×10^{4}	1.12×10^{4}			
ZmHXK6 Δ 30	V _{max}	3.60 ± 0.14	2.61 ± 0.47	3.08 ± 0.33	1.08 ± 0.32			
	Km	65.86 ± 15.19	4291.84 ± 1410.04	48.85 ± 1.06	198.85 ± 12.80			
	k _{cat} /K _m	5.40×10^{4}	6.01×10^{2}	6.23×10^{4}	5.36×10^{3}			
ZmHXK7	V _{max}	27.19 ± 0.77	23.44 ± 0.30	21.33 ± 0.54	13.21 ± 0.48			
	Km	108.10 ± 17.96	2701.85 ± 590.93	123.79±11.61	28.74 ± 0.30			
	k _{cat} /K _m	2.46×10^{5}	8.48×10^{3}	1.68×10^{5}	4.49×10^{5}			
ZmHXK8	V _{max}	17.38±0.24	NC	14.79 ± 0.99	10.91 ± 0.34			
	Km	4687 ± 299.53	NC	10,396.50 ± 54.31	147.20 ± 62.08			
	k _{cat} /K _m	3.66×10^{3}	NC	1.40×10^{3}	7.32×10^{4}			

Table 1 Kinetic parameters of maize HXKs

^a V_{max} is expressed in µmol hexose-6-P min⁻¹ mg⁻¹; Km is expressed in µM and k_{cat}/K_m in M⁻¹ s⁻¹; NC: Non-calculated since the enzyme does not reach the saturation

To obtain the K_m for hexoses the ATP concentration was fixed at 2 mM. To obtain the K_m for ATP, Glc was used at a fixed concentration of 5 mM except for ZmHXK8 that was fixed at 50 mM Glc. The kinetic parameters were obtained with Origin 8.0 software and the values represent the average ± standard deviation of two technical repeats from three independent replicates

using western blotting. The cytosolic fraction was free of mitochondrial contamination, and the mitochondrial fraction was free of cytosolic fraction, however both fractions are contaminated with nuclei, and the mitochondria fraction also with microsomal fraction (Additional file 1: Figure S6). The phosphorylating activity was determined using both cytosolic and mitochondrial fractions with Glc and Fru as substrates (Fig. 8a and b). Glc and Fru phosphorylating activity of the cytosolic fraction was similar at the tissues of the mature plant, with higher activity in the 24 h imbibed embryos. The mitochondrial fractions from aerial tissues, leaf sheath

Table 2 IC₅₀ for ADP, NAG and G6P for maize HXK activity

	IC ₅₀ (mM)					
	ADP	NAG	G6P			
ZmHXK4∆30	0.71 ± 0.15	52.14 ± 16.42	47.49 ± 2.89			
ZmHXK5∆30	0.69 ± 0.15	46.80 ± 1.82	47.46 ± 1.44			
ZmHXK6∆30	0.72 ± 0.14	25.15 ± 2.25	53.54 ± 2.48			
ZmHXK7	6.47 ± 1.14	15.01 ± 3.24	IS			
ZmHXK8	3.12 ± 1.14	37.54 ± 1.63	IS			

IS Insensitive, since the HXK activity was similar to the control HXK activity was determined using 5 mM Glc and 2 mM ATP, except for ZmHXK8 in which 50 mM Glc was used. The half maximal inhibitory values (IC₅₀) were obtained with Origin 8.0 software and the values represent the average \pm standard deviation of two technical repeats from three independent replicates

and leaf blade, together with the embryo showed similar Glc phosphorylating activity and higher than the roots and tassel. The tassel and the embryo mitochondrial fraction have the highest Fru phosphorylating activity.

HXK activity and expression profiles of maize HXKs during germination

Several molecules, including enzymes and mRNA that actively participate at the seed embryogenesis, are conserved and contribute to metabolism during germination [1, 2, 5]. Since high HXK activity was found in 24 h imbibed embryos, we analyzed the HXKs activity and the expression profile during the germination process (Fig. 8c-e). HXK activity was detected in the cytosol from dry embryos and increased until 48 h after imbibition (Fig. 8c). In contrast, the HXK activity at the mitochondrial fraction was similar to dry embryos at 48 h of imbibition (Fig. 8d). The contribution of the HXK activity of the cytosolic fraction at 48 h of embryo imbibition was higher than in the mitochondrial fraction (Fig. 8c-d). No differences in the phosphorylating activity were found using Glc or Fru as substrates (Fig. 8c-d).

The expression profile showed that the six analyzed maize HXKs were expressed during germination. However, each gene showed a particular expression profile (Fig. 8e). The mRNAs for *ZmHXK4* and *ZmHXK7* were detected in dry maize embryos, so they could be important during germination since they remain after the



desiccation phase of seed maturation. Except at 48 h, *ZmHXK4* decreased with the germination time. The expression of *ZmHXK7*, *ZmHXK8* and *ZmHXK9* constantly increased during germination, with *ZmHXK7*

showing the highest expression (Fig. 8e). At 24 h *ZmHXK6*, *ZmHXK7*, *ZmHXK8* and *ZmHXK9* are highly expressed, while low levels of expression were found for *ZmHXK4* and *ZmHXK5*.



Discussion

independent replicates

In this study, we demonstrated that six maize HXKs, ZmHXK4–9, are functional. The ZmHXKs differ in the activity level and substrate specificity. ZmHXK9 has minimal activity compared to the others. ZmHXK4–8 phosphorylate Glc and Man with high affinity, with

and Mitotracker channel. Bar = 10 µm. Representative images of four



ZmHXK9 Δ 30, translationally fused at the GFP carboxy-terminus, are shown. GFP signal shown in green, Mitotracker was used as mitochondrial marker, and it is shown in red. The merge corresponds to signals of bright field, GFP and Mitotracker channels or bright field, GFP and chlorophyll channels. Bar = 10 µm. Representative images of four independent replicates

ZmHXK8 having the lower catalytic efficiency for Glu, Man and Fru than ZmHXK4-7. ZmHXK7 was the member with the highest efficiency constant for ATP. In Arabidopsis, from the three catalytic AtHXKs, only AtHXK1 and AtHXK3 have been characterized enzymatically. AtHXK1 (mitochondrial attached protein) displays a $K_{\rm m}$ for Glc 89 μ M, $K_{\rm m}$ Fru 17 mM and $K_{\rm m}$ ATP 9.4 µM. AtHXK3 (chloroplast protein) showed a Kmapp Glc 61 µM, K_{mapp} Man 85 µM and K_{mapp} Fru 17 mM [18, 34, 41]. In rice, two of the ten members of the HXK family were characterized. OsHXK5 displayed a Km for Glc 190 μ M, and OsHXK6 has a K_m for Glc 200 μ M [23]. The K_m values for the hexoses in rice and Arabidopsis are similar with those obtained in this work. Moreover, five maize HXKs showed low affinity for Fru similar to HXKs from yeast, rat, parasites, pea seeds, potato tubers and spinach [7, 42, 43]. Unlike fructokinases, in vivo HXKs were suggested to preferably phosphorylate Glc rather than Fru because the Fru Km values were 8.7-22 mM for HXK and 0.001-0.10 mM for fructokinases [10, 44, 45].

An interesting feature of a group of maize HXKs is that the 30 amino acids at the N-terminus make the proteins insoluble in *E. coli* and for some of them also 105



modify their activity in the yeast mutant. There are several possible explanations for this effect. First, ZmHXK4–6 and 9 may be inserted to the outer membrane of the mitochondria, a feature that could be relevant since the three hexose-phosphorylating enzymes are cytosolic in the wild-type yeast strain [46]. Therefore, a different subcellular localization of HXKs could affect substrate availability. Second, the complete version of the enzyme possibly aggregates in the cytosol and reduces its activity. Third, the HXK N-terminus could be embedded in yeast membranes in a different way than in the plant mitochondrial membrane, resulting in altered enzyme activity. Thus far, these or other possibilities have not been considered and remain to be understood.

Conversely, the elimination of 30 amino acids at the N-terminus of ZmHXK9 demonstrated that this protein has enzymatic activity and is sufficient to allow for yeast growth in a medium supplemented with Glc or Fru as the carbon source. Therefore, ZmHXK4–9 must be functional HXKs, even if ZmHXK9 shows a marginal enzymatic 106

activity when is produced in E. coli, then its physiological relevance remains uncertain. The low activity of ZmHXK9 could be due to the cooperative effect of amino acid changes, like the presence of many synonymous amino acid substitutions in the hydrophobic channel of ZmHXK9 (see Additional file 1: Table S2 and Figure S7) that could affect enzyme activity, even if the hydrophobicity of the putative proton channel is retained; 2) ZmHXK9 has six additional polar amino acids at the large domain near the hinge (Additional file 1: Figure S7). A longer domain could affect the flexibility of the hinge and reduce interdomain interactions between the substrates and the large and small domains; 3) the change of $Pro^{133} \rightarrow Glu^{133}$ (position relative to AtHXK1) and $Gly^{310} \rightarrow Asp^{310}$ (see Additional file 1: Figure S7), which could increase the enzyme flexibility and affects Glc binding. Gly 310 is conserved in catalytic enzymes but it is absent in HKL-such as AtHXL1, AtHXL2, OsHXK3, and OsHXK10-and in the predicted ZmHXK3a, ZmHXK3b, and ZmHXK10 [20, 25, 32, 47].

The metabolic responses to the substrate and product concentration combined with their subcellular localization might contribute to HXK activity and function. One reported classification recognized four types of HXKs in plants. We were able to differentiate between two types, cytosolic and mitochondrial HXK isoenzymes, using two methods. The first was to determine the effect of ADP, NAG and G6P. This allowed for us to differentiate two types of maize HXKs, one with high sensitivity to these molecules such as ZmHXK4-6, and the other with low sensitivity such as ZmHXK7-8. There is no information about the sensitivities of the enzymes in rice or Arabidopsis for any inhibitor [9]. However, previous results using cytosolic and mitochondrial maize root fractions are similar to what we found in this study [21, 27, 34]. The sensitivity to inhibitors together with the localization studies using the full and truncated version of each HXK confirmed that in maize, there are apparently only two types of HXKs: B and C. Type B HXKs have a membrane anchor amino acid sequence that directs the protein to the mitochondria (Fig. 2b, Additional file 1: Table S3). In maize, the type B HXK members are ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6, and ZmHXK9. Conversely, type C or cytosolic HXKs are present only in monocotyledonous plants and the moss Physcomitrella patens [9, 12, 25, 48]. In maize, they are represented by ZmHXK7 and ZmHXK8.

There are no chloroplast or Golgi HXKs as suggested before [9, 26], the localization analysis on protoplast corroborates the phylogenetic analysis, in which only dicot plants have plastid HXK (Additional file 1: Figure S1). The absence of a chloroplast HXK (type A HXKs) in maize suggests that Glc is phosphorylated by cytosolic isoenzymes and used in starch and fatty acid synthesis when night-time energy supply is limited in the chloroplast [24, 37, 48–51]. However, it was also suggested that type A HXKs are only expressed in plants that tend to accumulate starch, which is not the case in maize [25, 52]. Either ZmHXK7 or ZmHXK8 could participate in these processes.

The first 30 amino acids at the N-terminus in ZmHXK4, ZmHXK5, and ZmHXK9 are necessary and sufficient to attach these proteins to the mitochondria in addition to their role in modifying the enzymatic activity (Fig. 4). In maize, one HXK was solubilized from the mitochondria using the zwitterionic detergent CHAPS, demonstrating their integration into the outer mitochondrial membrane. Apparently, the large hydrophobic peptide at the N-terminus from plant HXKs is inserted in the outer membrane of the mitochondria in a manner different than mammalian HXKs. This difference was probably the reason for the high resistance to G6P to the clotrimazole drug inhibition shown by plant HXKs as G6P and clotrimazole induce HXK detachment from the mitochondria in mammals [28]. The role of the first 30 amino acids in ZmHXK6 is not clear because the low level of cytosolic protein that was found was accompanied by large fluorescence aggregates (Fig. 4c, Fig. 5c). This fluorescence pattern was also observed in another type B HXK [36-38].

HXKs attached to the outer mitochondrial membrane are involved in numerous physiological processes given their strategic localization. This was suggested to represent an advantage over the use of ATP. For instance, in *A. thaliana*, HXKs are embedded in the outer mitochondrial membrane as a part of the glycolytic metabolon [39, 40]. In potato, mitochondrial HXKs regulate ROS in tissues with an intensive oxidative metabolism [34]. In tobacco, mitochondrial HXK protects against programmed cell death induced by ROS and confers plant resistance to pathogen attack [53, 54]. We speculate each one might play a different role in the cell that due to the variability of Type B HXKs in maize.

During germination, the quiescent dry seed resumes its metabolic activity with water uptake, and the carbon source from embryonic tissues is required for completing the germination [2, 5]. The transcripts for mitochondrial HXKs ZmHXK5 and ZmHXK6 were detected at low levels in dry maize embryos (Fig. 8e). They may participate in seed embryogenesis because they remain after the desiccation phase. However, at early stages of germination, the mitochondrial HXK activity was high, and it was maintained until 48 h of germination (Fig. 8d), even though there is an increase in the oxygen uptake with the consequent stimulation of mitochondrial biogenesis [4, 5, 55]. The activity of mitochondrial HXKs like ZmHXK4 that was highly expressed in embryos after 8 h of germination could be important to the general metabolism. The high expression of ZmHXK9 intriguing since very low activity was detected for this enzyme, but its participation together with ZmHXK4–6 cannot be excluded. This could indicate a metabolic and a sensor role. Furthermore, since the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀ values) of the mitochondrial isoforms is similar (Table 2), it would be difficult to use these inhibitors to distinguish their effects.

In regard to the cytosolic HXKs, during the embryo development, two cytosolic HXKs show a considerable difference in their Km for Glc [17, 56]. According to the kinetic characteristics and cytosolic localization of the recombinant enzymes analyzed here, the described activity of high- and low-affinity enzymes could be attributed to ZmHXK7 and ZmHXK8, respectively. During maize seed development, increased HXK activity coincides with the active phase of fatty acid synthesis. ZmHXK7 and ZmHXK8 could supply G6P to feed both the OPPP and fatty acid synthesis in the plastid to store reserves in the scutellum [57, 58]. However, the metabolic role during germination could be different since different metabolites are present. In rape, cauliflower, sugar beet, and radish, the content of ATP ranged from 0 to 0.2 nmol/ seed in non-imbibed seeds and rise to 0.3 to 1.2 after 3 h of imbibition [59, 60]. The high expression of ZmHXK7, an enzyme with a small K_m for ATP and low sensitivity for ADP, may confer an advantage for the cell at early times in germination to start the hexose metabolism. In rice, the orthologous gene OsHXK7 is necessary to complete germination under hypoxia, suggesting an important role in ATP generation mainly through fermentation [12, 61]. This result might be explained by the biochemical characteristics of the protein identified in this study and the presence of the ZmHXK7 transcripts.

In germinated embryos, the reduction in lipid reserves in the scutellum overlaps with the sugar biosynthesis [5]. The transitory accumulation of sugars could be the driving force to express different set of HXK isoenzymes. For instance, the two cytosolic enzymes, ZmHXK7 and ZmHXK8, differ in two orders of magnitude in their specificity constant. The sudden increase in the ZmHXK8 mRNA at 8 h of germination and the accompanied increase in the cytosolic HXK activity (Fig. 8c and e) could be associated with the required production of G6P to feed the OPPP, involved in cell wall and nucleic acids biosynthesis but also to create the appropriate redox state to promote the production of ATP through the electron transport chain and the reduction of disulfide bonds of important enzymes that promote the proteolysis and starch degradation to accelerate the reserve mobilization [1, 5].

Conclusions

In this study, six HXKs from maize were characterized based on their substrate preferences, sensitivity to product inhibition and subcellular localization. We

demonstrated that ZmHXK4-9 are functional HXKs. ZmHXK7 and ZmHXK8 are cytosolic proteins that phosphorylate Man and Glc, rather than Fru. Both enzymes have low sensitivity to inhibition by G6P and ADP with differences in their K_m value for Glc. By contrast, ZmHXK4-6 are mitochondrial proteins that phosphorylate Man, Glc, and Fru with a similar K_m for each hexose. Marginal HXK activity was found for ZmHXK9. At the N-terminus, in the ZmHXK4-6 and ZmHXK9 sequences, 30 amino acids were required to attach these proteins to the mitochondrial membrane, and their presence modified the HXK activity. We also show that dry and imbibed embryos express different sets of HXKs. ZmHXK4 and 7 transcripts were detected in dry embryos, while at 24 h of germination; the most abundant transcripts were ZmHXK5-9. Our results suggest that ZmHXK4 harbors the higher HXK activity detected in mitochondria. Likewise, ZmHXK7 contributes to the hexose phosphorylation at early germination times at the cytosol and together with ZmHXK8 at later times, considering the differences in their biochemical parameters we suggest that they may not only be redundant proteins but may also have specific roles depending on carbon availability, metabolic needs, or sensor requirements. Further investigation is required to understand their specific physiological roles as sensors or metabolite producers during various developmental processes using transgenic plants with gene knock outs.

Methods

Plant materials

Zea mays var. Chalqueño seed embryos were obtained by manual dissection. Embryos were disinfected with a 0.12% hypochlorite solution and allowed to grow in 1% agar in different times at 29 °C in darkness. Mature maize plants were obtained by planting seeds in an experimental field close to Facultad de Química, UNAM (19°19'24.4"N 99°10' 37.9"W) and the tissues were collected after 3 months of growth. Maize tissues were frozen in liquid nitrogen, ground to a fine powder, and stored at - 80 °C until use. All maize tissues were used to determine the HXK activity. Embryos were also used to determine the expression profile of ZmHXKs along the embryo germination and to clone the ORF of six putative catalytically active HXKs. The HXK activity of each recombinant protein was determined in vitro and by yeast complementation assay. The subcellular localization of ZmHXK4-9 was made in protoplast from Arabidopsis thaliana plants. The A. thaliana seeds ecotype Columbia (Col-0) were obtained from ABRC and were sown in pots containing Sunshine 3. After 2 days at 4 °C for stratification, plants were grown for 3-4 weeks in a growth chamber (120–150 µmol/m²sec, 20–22 °C).

Analysis and subcellular localization prediction of maize HXKs

The gene sequences of maize, *A. thaliana* and rice HXKs were obtained from EnsemblPlants and NCBI. The ID of the genes under study is included in the Additional file 1: Table S1 . Sequence identity analyses were performed for ZmHXK3–10 with Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/). SeaView 4 software was used to search for conserved domains by inspection [33] using sites that are present in AtHXK1 as a reference [20, 33]. TargetP 1.1 and Toppred 1.10 were used to predict subcellular protein localization http:// www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) [35], and http://moby le.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred.

RT-qPCR analysis

Maize embryo total RNA was extracted using TRIzol™ Reagent (Invitrogen[™], Thermo Fisher Scientific) according the manufacturer's instructions. RNA purity and integrity were assessed on an agarose gel using the 28S and 18S ribosomal band's intensity as reference. One microgram of total RNA was used for reverse transcription with the ImProm-II[™] Reverse Transcription System (Promega). Relative expression of ZmHXK4-9 in the embryo tissues was obtained by qPCR. To ensure the validity of the results we evaluated the specificity and efficiency of the gPCR for each pair of primers used to amplify the HXK (Additional file 1: Table S4). The set of primers with efficiency above 95% were chosen. The efficiency was calculated using a calibration curve with a serial dilution of cDNA (1,1; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000) and the formula: $E = (10^{[-1/m]})*100$, where m is the slope curve of Ct vs logarithmic concentration. qPCR was performed in the thermocycler 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). The PCR Reaction mix contained 10 µL SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 0.15 µL primer forward 20 µM, 0.15 µL primer reverse 20 µM, 2 µL cDNA, and 7.7 µL nuclease free water. Expression of endogenous gene Zm18s [62] was used as control. Relative expression was calculated using the formula: Ratio expression = Etar- $(\Delta CPtarget(control-sample)/E_{ref})$ $(\Delta CPref(control-sample))$ [63], where E_{target} is the amplification efficiency of the target gene, ΔCP_{target} is the Ct value of the control sample (ZmHXK4 expression at 0 h) minus Ct value of treated samples, Eref is the amplification efficiency of the endogenous gene, and ΔCP_{ref} is the Ct value of endogenous gene in the control sample minus Ct value of endogenous gene in treatment samples [63].

The PCR conditions were as follows: one cycle of 3 min at 94 °C, the amplification was done for 30 s at 98 °C, 1 min at 60 °C, 1 min at 72 °C for 28 cycles for *ZmHXK7* and *ZmHXK8* and for *ZmHXK4-ZmHXK6* and *ZmHXK9* was 30 cycles, and finally, one cycle of 10

min at 72 °C. PCR products were resolved by electrophoresis on 2.0% agarose gels. Each experiment was executed from the same quantity of total RNA.

Cloning and plasmid constructs

Maize HXK clones were obtained from cDNA of 24 h imbibed embryos. Primers were designed for the candidate genes specific 5' and 3' untranslated regions (UTRs) using the Primer3Plus software (http:// www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus. cgi): ZmHXK4-UTR 5'-GGAGGGAGATTGGTTCGT-3' and 5'-CGGATAGCCACIDOCAAGGA-3', ZmH XK5-UTR 5'-TAGTTCGCTGGAGGAGTTGG-3' and 5'-TCGATCCACACCAGTTTTCA-3', ZmHXK6-UTR 5'-AGCTGGTGCGTACTTGGTTT-3' and 5'-GGATGGA CGGCTTATTCA-3', ZmHXK7-UTR 5'- GTCGCA GCTTTCTTTCGTGT-3' and 5'-AGGATTCAGCAC-GAGTTGC-3', ZmHXK8-UTR 5'-GCCAGGACT CTTGATTTGCT-3' and 5'-CTGCAGACGCTGGA-CAGTTA-3', ZmHXK9-UTR 5'-ACTCCCGTGGCAGT-GATAC-3' and 5'-CGTCGGATACACACAGAGG-3'. The AtHXK1 clone was obtained from the cDNA of 7-day-old A. thaliana seedlings; the primer pair used was also designed with Primer3Plus software (AtHX-K1-UTR 5'-ATGGGTAAAGTAGCTGTTGGAG-3' and 5'TTAAGAGTCTTCAAGGTAGAGAGAGTG-3'). The PCR conditions were the same as described above. PCR products were resolved by electrophoresis on 2.0% agarose gels. PCR products were purified from preparative gels and cloned in the pGEM[®]-T Easy vector (Promega) with T4 DNA ligase according to the manufacturer's instructions. Ligation products were used to transform the competent Escherichia coli DH5a. The recombinant vectors were sequenced to verify the clone identity and insert direction. Gateway® technology was used to subclone the different HXKs into the donor and destination vectors. The ORFs of the HXKs genes that lacked the stop codon were flanked with *attB/P* sequences through two PCR rounds employing pGEM-HXK constructs (Additional file 1: Table S4) as template and using the Advantage HD polymerase (Clontech). The products were cloned into the pDNOR[™]221 vector (Thermo Fisher Scientific) by BP clonase (Invitrogen) to generate entry clones. Plasmid constructs in the pDNOR[™]221 vector encoding N-terminal truncated variants of ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 and ZmHXK9 were produced by amplifying the ORF of each HXK gene that lacked the 87 nucleotides after the start codon (Additional file 1: Table S4). These variants were named $ZmHXK4\Delta 30$, ZmHXK5∆30, ZmHXK6∆30 and ZmHXK9 Δ 30. The obtained constructs were sequenced to confirm deletion and correct insertion of the gene into the vector.

Expression and purification of recombinant maize HXKs

HXK subcloning from the entry clone to destination vector pET-DEST[™]42 (Thermo Fisher Scientific) was performed with LR clonase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. This vector added a V5 epitope and 6xHis tag at the carboxy-terminus of each HXK for detection and protein purification. BL21-CodonPlus™ (DE3)-RIL (Stratagene) competent E. coli cells were transformed with the expression clones. For protein induction, 100 µL of each clone was grown in 100 mL of LB supplemented with 100 µg/mL ampicillin and 34 µg/mL chloramphenicol and incubated for 16h at 37°C under constant agitation (200 rpm). The saturated culture was added to 1 L of LB and incubated at 37 °C with constant agitation (150 rpm). Cells were induced at 0.600 units of absorbance at 600 nm with 0.75 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (Promega) and grown at 25° C for 2 h for ZmHXK7 and ZmHXK8; 4 h for ZmHXK4A30, ZmHXK5A30 and ZmHXK9A30; and 6 h for ZmHXK6∆30. Cells were harvested by centrifugation (5 min at 4000 xg), and the pellet was resuspended in 30 mL of lysis buffer (500 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ pH 8.0 and 5 mM benzamidine) and incubated on ice for 10 min. The cell suspension was sonicated for 5 min with 15 s pulses at intervals of 15 s. After 5 min of centrifugation at 13,000 xg at 4 °C, the supernatant was loaded onto a Ni²⁺ affinity column (05893682001, Roche) previously equilibrated with 30 mL of equilibrium buffer (50 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol and 5 mM benzamidine) and incubated for 2 h at 4 °C. The column was washed with 60 mL of equilibrium buffer, and the bound protein was eluted with 6 mL of elution buffer (50 mM pH 8.0 NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 5 mM benzamidine and Imidazol 50-250 mM) and collected in 1 mL fractions. All the fractions were concentrated by centrifugation, and the buffer was exchanged for 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ pH 8.0 and 5 mM benzamidine, with an Amicon 30 kDa (Millipore). Glycerol was added to each concentrated fraction to a 10% final concentration and stored at - 20 °C until use.

Recombinant protein detection

Purified recombinant HXK fractions were separated in a 12% SDS-PAGE and transferred in a wet chamber to a polyviniledene fluoride membrane (PVDF) according to Tobwin et al., [64]. The membranes were blocked for 1 h with 5% defatted milk in TTBS (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.1% Tween-20 and 150 mM NaCl). Since all the proteins have the V5 epitope at the C-terminal, the membranes were probed with a 1:5000 dilution of Anti-V5-HRP (R961–25, Invitrogen), and incubated for 1.5 h at 30 °C. To develop the peroxidase reaction chemiluminescent substrate was added (WBKLS0500, Merck-Millipore) and detected with the ChemiDoc[∞]MP (Bio-Rad).

Isolation of cytosolic and mitochondrial fractions

Roots, leaf blades, leaf sheaths and tassels of three months maize plants and the 24 h imbibed seed embryos were frozen in liquid N₂ and kept at -70 °C. Two grams of each tissue was crushed, and the fine powder was homogenized in buffer (50 mM Hepes/KOH pH 7.0, 300 mM sorbitol, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF and 1 tablet of protease inhibitor cocktail per 50 mL, Complete, Roche, Mannheim, Germany) in a ratio of 2 volumes per 1 g of tissue, using a tissue tearor homogenizer (Biospec Products, Daigger and Co. Inc. Vernon Hill, Il, USA) for 60s. The tissue was filtered through a four-layer of pre-wet cheesecloth; the filtrate was centrifuged 5 min at 2400 g at 4 °C. The supernatant was centrifuged at 14,000 g for 10 min. The pellet contained the mitochondria fraction and the supernatant contained the cytosolic fraction. The supernatant was centrifuged at 110,000 g for 45 min in a TLA-100.4 rotor in an Optima TL-100 Centrifuge (Beckman, Palo Alto, CA, USA) at 4°C to eliminate the microsomal fraction. The supernatant or cytosolic fraction was supplemented with 10% glycerol and stored at - 70°C until use. The mitochondrial fraction was washed with 1 mL of homogenization buffer and centrifuged at 14,000 g for 10 min. The pellet was resuspended in 1 mL of homogenization buffer supplemented with 10% of glycerol and stored in aliquots at -70°C until use.

Protein determination

The protein concentration was determined by the Bradford method [65] using BSA as the standard.

HXK activity assay

HXK activity assays were performed as described previously by Dai [18] with some modifications. Briefly, the assay reaction was performed in a 96 microplate format to determine both Glc and Fru HXK activity. The reaction medium contained 50 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 15 mM KCl, 2 mM ATP, 2 mM phosphoenolpyruvate, 1 U/mL Glc-6-phosphate dehydrogenase, 7 U/mL pyruvate kinase (PK) and 4 mM NADP+, 0.01-100 mM Glc or 0.5-200 mM Fru in a 250 µL final volume. When Fru was the substrate, 3 U/mL phosphoglucose isomerase was added. To obtain the ATP Km value, its concentration was set in the range of 10 to $1000 \,\mu\text{M}$ with a fixed Glc concentration of 5 mM except for ZmHXK8 that was set at 50 mM. To HXK inhibition assays, ADP concentrations ranged from 0.5 to 15 mM and N-acetylglucosamine (NAG) from 1 to 150 mM with fixed 5 mM Glc and 2 mM ATP, except for ZmHXK8 in which 50 mM Glc was set. In these three cases, 5 or 50 mM Glc was used as a substrate. The reaction medium was different both to determine the Man 110 HXK activity, and when Glc-6-P (G6P) was used as the HXK inhibitor, the reaction mixture contained 50 mM NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄ pH 8.0, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 15 mM KCl, 2 mM ATP, 7 U/mL PK, 10 U/mL Lactate dehydrogenase and 2.5 mM NADH. Man was assayed from 0.5 to 100 mM and 10 to 150 mM for G6P inhibition. The reaction started by adding 2.5 µg of recombinant protein or 40 µg of mitochondrial or cytosolic fractions. The absorbance at 340 nm was read every 15 s for 5 min with an Epoch[™] microplate reader (Bio Tek). The curves were analyzed with the Gen5[™] Microplate Data Analysis software. The K_m , k_{cat} , V_{max} and IC₅₀ values were obtained with OriginPro 8.0 software (OriginLab Corporation).

Yeast complementation assay

Maize HXKs (full and truncated versions without any tag) and AtHXK1 entry clones were subcloned into the pDRf1 vector [66] (Addgene plasmid # 36026) using the Gateway® technology. S. cerevisiae JT 20088 genetic W303-1a (hxk1::HIS3 background hxk2::LEU2 glk1::LEU2) was transformed with each pDRf1-HXK construct according to Gietz [67]. The results of the complementation assay were verified by screening transformants in a solid plate of SGal-URA (synthetic defined medium with galactose and uracil). Selected clones were grown overnight in SGal-URA liquid medium. The next day, 250 µL of saturated medium was added to 1 ml of fresh SGal-URA to reach an absorbance between 0.5-0.6 units at 600 nm. Tenfold serial dilution were made from this culture, and 10 µL of each dilution was grown in SGal-URA, SGlc-URA, SFru-URA plates and incubated at 30 °C for 2 days.

An expression analysis for each ZmHXK gene was made for each yeast mutant. The RNA was extracted using TRIzol^{**} Reagent (Invitrogen^{**}, Thermo Fisher Scientific) according the manufacturer's instructions. The cDNA was produced as described before and the list of primers used for this assay is in the Additional file 1: Table S4. The PCR conditions were as follows: one cycle of 3 min at 94 °C, the amplification was done for 30 s at 98 °C, 1 min at 60 °C, 1 min at 72 °C for 28 cycles for ZmHXK7 and ZmHXK8 and for ZmHXK4-ZmHXK6 and ZmHXK9 was 30 cycles, and finally, one cycle of 10 min at 72 °C. PCR products were resolved by electrophoresis on 2.0% agarose gels. Each experiment was executed from the same quantity of total RNA.

Subcellular localization of ZmHXK:GFP

HXK entry clones were digested with the restriction enzyme *MluI* (FD0564, Thermo Scientific), and fragments of approximately 3000 bp were subcloned into the pEarleyGate 103 binary vector using the Gateway[®] technology [68]. To express the HXK-GFP fusions in a transient assay, A. thaliana protoplasts were made according to Yoo [69]. Leaves from 3 to 4 weeks old of A. thaliana (Col-0) plants were used for protoplast isolation. Transfection was performed via the PEG-calcium method. As a control of transfection, the plasmid HBT-sGFP (S65 T)-NOS was used (Stock # CD3-911 from ABRC/https://www.arabidopsis.org). After 18 h of transfection, protoplasts were stained to visualize the mitochondria with 75 nM Mitotracker® RED CMXRos (Molecular Probes, Eugene, OR) for 5 min in dark conditions. GFP fluorescence was monitored with a confocal Microscope Olympus FV1000 using 488 nm/505-545 nm (excitation/emission) and 581 nm/644 nm (excitation/emission).

Additional file

Additional file 1: Information Figure S1 and Table S1. Figure S1. Molecular phylogenetic analysis for plant HXKs. Table S1. ID numbers of the HXK gene families used for the phylogenetic analysis. Table S2. Comparison of conserved amino acids at catalytic and substrate binding domains between ZmHXKs with AtHXK1 [33]. Figure S2. SDS-PAGE of full versions of recombinant ZmHXKs. Purification process of recombinant: (A) ZmHXK4, (B) ZmHXK5, (C) ZmHXK6, (D) ZmHXK7, and (E) ZmHXK8. St: Molecular weight standard, P: Pellet clarified with urea, S: Soluble supernatant, U: Unbound, W: Wash, EX: Elution. Figure S3. Purification of truncated versions of recombinant ZmHXKs. Purification process of recombinant: (A) ZmHXK4A30, (B) ZmHXK5A30, (C) ZmHXK6A30 and (D) ZmHXK9∆30. All fractions were separated by SDS-PAGE and stained with Coomasie blue. (E) Western Blot of full and truncated versions of ZmHXK4-6. The proteins were detected using the anti-V5-HRP. St: Molecular weight standard, T: Total cell extract S: Soluble supernatant, U: Unbound, W: Wash, EX: Elution. Figure S4. Inhibitory effects of ADP, NAG and G6P on ZmHXKs. (A, B, C) ZmHXKA4, (D, E, F) ZmHXKA5, (G, H, I) ZmHXKA6, (J, K, L) ZmHXK7, and (M, N, O) ZmHXK8. Figure S5. Expression profile of full and truncated versions of ZmHXKs in the JT 20088 yeast mutant. Table S3. Subcellular prediction of ZmHXKs.Figure S6. Evaluation of cytosolic and mitochondrial purity using specific antibodies. The purity of the cytosolic (Cyt), mitochondrial washed (wMit) and mitochondrial Percoll purified (pMit) fractions (10 µg) was evaluated by Western blot using Agrisera (Vännäs, Sweden) antibodies. These are representative membranes of at least three replicates. Figure S7. Changes in the amino acids of ZmHXK9 that could explain its low activity. The sequences were aligned using SeaView 4 [33]. Table S4. List of primers used for qPCR analysis, subcloning each maize HXK and PCR analysis in the yeast mutant. Uniprot¹ (https://www.uniprot.org/uniprot The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. Nucleic Acids Res. 2017;45:D158-9), PLAZA² (https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/), EnsemblPlants³ (http:// plants.ensembl.org/index.html) and NCBI4 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Table S2 Comparison of conserved amino acids at catalytic and substrate binding domains between maize HXKs with AtHXK1 [33]. Figure S2: (A) ZmHXK4, (B) ZmHXK5, (C) (PDF 1360 kb)

Abbreviations

Fru: Fructose; G6P: GIc-6-P; GFP: Green Fluorescent Protein; GIc: Glucose; HKL: HXK-like; HXK: Hexokinase; IC₅₀; half maximal inhibitory; Man: D-Mannose; NAG: N-Acetylglucosamine; OPPP: oxidative pentose phosphate pathway, ORF, open reading frame (ORF); PVDF: polyviniledene fluoride membrane; SFru-URA: Synthetic defined medium with Fru and uracil; SGal-URA: Synthetic defined medium with Galactose and uracil; SGlc-URA: Synthetic defined medium with Glu and uracil; TCA: tricarboxylic acids cycle



We are grateful to Dr. Karina Jiménez-Durán at Laboratorio de Microscopía Confocal, Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria, Facultad de Química, for the technical support with the confocal microscopy images. We would also like to thank M. in Sci. Beatriz King-Díaz for her technical support on the Western and qPCR analysis, M. in Sci. Montserrat López-Coria for the qPCR analysis and Dr. José Antonio Pedroza-García for critically reading the manuscript.

Funding

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant 239605 and Chemistry Faculty grant number 50009125 to SSN supported this work. Research infrastructure in the biochemistry department was funded with CONACyT grant 252001. CONACyT also supported with the fellowships 25676 and 370274 for the Ph.D. studies of GPAA (Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México).

Availability of data and materials

Data supporting the results can be found in Additional file 1 and any other datasets used and/or analyzed during the current study is available from the corresponding author on reasonable request.

Author's contributions

AAGP designed, performed, analyzed experiments and wrote the manuscript; AAGG provided bacterial strains, vectors, strategies to recombinant protein production and contributed to manuscript editing; SAEA performed and analyzed the HXK activity in the tissues of mature plants; SSN designed, analyzed experiments and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Conjunto E., Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, Mexico. ²Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico.

Received: 3 August 2018 Accepted: 17 December 2018 Published online: 15 January 2019

References

- Rosental L, Nonogaki H, Fait A. Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. Seed Sci Res. 2014;24:1–15.
- Han C, Yang P. Studies on the molecular mechanisms of seed germination. Proteomics. 2015;15:1671–9.
- Larondelle Y, Corbineau F, Dethier M, Come D, Hers H-G. Fructose 2, 6bisphosphate in germinating oat seeds a biochemical study of seed dormancy. Eur J Biochem. 1937;166:605–10.
- Sánchez-Linares L, Gavilanes-Ruíz M, Díaz-Pontones D, Guzmán-Chávez F, Calzada-Alejo V, Zurita-Villegas V, et al. Early carbon mobilization and radicle protrusion in maize germination. J Exp Bot. 2012;63:4513–26.
- Weitbrecht K, Müller K, Leubner-Metzger G. First off the mark: early seed germination. J Exp Bot. 2011;62:3289–09.
- Li L, Sheen J. Dynamic and diverse sugar signaling. Curr Opin Plant Biol. 2016;33:116–25.
- Claeyssen É, Rivoal J. Isozymes of plant hexokinase: occurrence, properties and functions. Phytochemistry. 2007;68:709–31.
- Aguilera-Alvarado GP, Sánchez-Nieto S. Plant hexokinases are multifaceted proteins. Plant Cell Physiol. 2017;58:1151–60.

- Galina A, Da Silva WS. Hexokinase activity alters sugar-nucleotide formation in maize root homogenates. Phytochemistry. 2000;53:29–37.
- Granot D, David-Schwartz R, Kelly G. Hexose kinases and their role in sugarsensing and plant development. Front Plant Sci. 2013;4:44.
- Matheson NK, Myerst DK. Inhibition of germination by glucose analogues that are hexokinase substrates. Phytochemistry. 1998;48:241–8.
- Kim HB, Cho JI, Ryoo N, Shin DH, Park YI, Hwang YS, et al. Role of rice cytosolic hexokinase OsHXK7 in sugar signaling and metabolism. J Integr Plant Biol. 2015;58:127–35.
- Cho YH, Yoo SD, Sheen J. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. Cell. 2006;127:579–89.
- Jang JC, León P, Zhou L, Sheen J. Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. Plant Cell. 1997;9:5–19.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hal Q, Cheng W-H, Liu Y-X, et al. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. Science. 2003;300:332–6.
- Yanagisawa S, Yoo SD, Sheen J. Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. Nature. 2003;425:521–5.
- Cox EL, Dickinson DB. Hexokinase from maize endosperm and scutellum. Plant Physiol. 1973;51:960–6.
- Dai N, Schaffer A, Petreikov M, Shahak Y, Giller Y, Ratner K, et al. Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. Plant Cell. 1999;11:1253–66.
- Damari-Weissler H, Kandel-Kfir M, Gidoni D, Mett A, Belausov E, Granot D. Evidence for intracellular spatial separation of hexokinases and fructokinases in tomato plants. Planta. 2006;224:1495–02.
- Feng J, Zhao S, Chen X, Wang W, Dong W, Chen J, et al. Biochemical and structural study of *Arabidopsis* hexokinase 1. Acta Crystallogr sect D biol Crystallogr. 2015; 2015;71:367–75.
- Galina A, Reis M, Albuquerque MC, Gómez-Puyou A, Gómez-Puyou MT, de Meis L. Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. Biochem J. 1995;309:105–12.
- Giese J-O, Herbers K, Hoffmann M, Klösgen RB, Sonnewald U. Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from *Nicotiana tabacum*. FEBS Lett. 2005;579:827–31.
- Kano A, Fukumoto T, Ohtani K, Yoshihara A, Ohara T, Tajima S, et al. The rare sugar D-allose acts as a triggering molecule of rice defense via ROS generation. J Exp Bot. 2013;64:4939–51.
- Veramendi J, Roessner U, Renz A, Willmitzer L, Trethewey RN. Antisense repression of hexokinase 1 leads to an overaccumulation of starch in leaves of transgenic potato plants but not to significant changes in tuber carbohydrate metabolism. Plant Physiol. 1992;121:123–34.
- Karve R, Lauria M, Virnig A, Xia X, Rauh BL, Moore BD. Evolutionary lineages and functional diversification of plant hexokinases. Mol Plant. 2010;3:334–46.
- Zhang Z, Zhang J, Chen Y, Li R, Wang H, Ding L, et al. Isolation, structural analysis, and expression characteristics of the maize (*Zea mays* L.) hexokinase gene family. Mol Biol Rep. 2014;41:6157–66.
- da-Silva WS, Rezende GL, Galina A. Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. J Exp Bot. 2001;52:1191–201.
- Rezende GL, Logullo C, Meyer L, Machado LB, Oliveira-Carvalho AL, Zingali RB, et al. Partial purification of tightly bound mitochondrial hexokinase from maize (*Zea mays* L.) root membranes. Brazilan J Med Biol Res. 2006;39:1159–69.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Comp Appl Biosci. 1992;8:275–82.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biol Evol. 2018;35:1547–9.
- Van Bel M, Diels T, Vancaester E, Kreft L, Botzki A, Van de Peer Y, Coppens F, Vandepoele K. PLAZA 4.0: an integrative resource for functional, evolutionary and comparative plant genomics. Nucleic Acids Res. 2018;46:D1190–6.
- Karve A, Rauh BL, Xia X, Kandasamy M, Meagher RB, Sheen J, et al. Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis*. Planta. 2008;228:411–25.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Mol Biol Evol. 2010;27:221–4.
- Camacho-Pereira J, Meyer LE, Machado LB, Oliveira MF, Galina A. Reactive oxygen species production by potato tuber mitochondria is modulated by mitochondrially bound hexokinase activity. Plant Physiol. 2009;149:1099–1102



- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol. 2000;300:1005–16.
- Balasubramanian R, Karve A, Kandasamy M, Meagher RB, Moore B. A role for F-actin in hexokinase-mediated glucose signaling. Plant Physiol. 2007;145: 1423–34.
- Cheng W, Zhang H, Zhou X, Liu H, Liu Y, Li J, et al. Subcellular localization of rice hexokinase (OsHXK) family members in the mesophyll protoplasts of tobacco. Biol Plant. 2011;55:173–7.
- Cho J-I, Ryoo N, Eom J, Lee D-W, Kim H, Jeong S, et al. Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. Plant Physiol. 2009; 149:745–59.
- Giegé P, Heazlewood JL, Roessner-Tunali U, Millar AH, Fernie AR, Leaver CJ, et al. Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. Plant Cell. 2003;15:2140–51.
- Graham JWA, Williams TCR, Morgan M, Fernie AR, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ. Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. Plant Cell. 2007;19: 3723–38.
- Zhang ZW, Yuan S, Xu F, Yang H, Zhang NH, Cheng J, et al. The plastid hexokinase pHXK: a node of convergence for sugar and plastid signals in *Arabidopsis*. FEBS Lett. 2010;584:3573–9.
- Cárdenas ML, Cornish-Bowden A, Ureta T. Evolution and regulatory role of the hexokinases. Biochim Biophys Acta. 1998;1401:242–64.
- Sun M, Liao S, Zhang L, Wu C, Qi N, Lv M, et al. Molecular and biochemical characterization of Eimeria tenella hexokinase. Parasitol Res. 2016;115:3425–33.
- Pego JV, Smeekens SCM. Plant fructokinases: a sweet family get-together. Trends Plant Sci. 2000;5:531–6.
- Riggs JW, Cavales PC, Chapiro SM, Callis J. Identification and biochemical characterization of the fructokinase gene family in *Arabidopsis thaliana*. BMC Plant Biol. 2017;17:83. https://doi.org/10.1186/s12870-017-1031-5.
- Randez-Gil F, Sanz P, Entian KD, Prieto JA. Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. Mol Cell Biol. 1998;18:2940–8.
- Kuser P, Cupri F, Bleicher L, Polikarpov I. Crystal structure of yeast hexokinase PI in complex with glucose: a classical "induced fit" example revised. Proteins Struct Funct Genet. 2008;72:731–40.
- Cho J-I, Ryoo N, Ko S, Lee S-K, Lee J, Jung K-H, et al. Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). Planta. 2006;224:598–11.
- Kandel-Kfir M, Damari-Weissler H, German MA, Gidoni D, Mett A, Belausov E, et al. Two newly identified membrane-associated and plastidic tomato HXKs: characteristics, predicted structure and intracellular localization. Planta. 2006;224:1341–52.
- Nilsson A, Olsson T, Ulfstedt M, Thelander M, Ronne H. Two novel types of hexokinases in the moss *Physcomitrella patens*. BMC Plant Biol. 2011;11:32.
- Olsson T, Thelander M, Ronne H. A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. J Biol Chem. 2003;278:44439–47.
- Miyake H. Starch accumulation in the bundle sheaths of C3 plants: a possible pre-condition for C4 photosynthesis. Plant Cell Physiol. 2017;57:890–6.
- Kim M, Lim JH, Ahn CS, Park K, Kim GT, Kim WT, et al. Mitochondriaassociated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. Plant Cell. 2006;18:2341–55.
- Sarowar S, Lee JY, Ahn ER, Pai HS. A role of hexokinases in plant resistance to oxidative stress and pathogen infection. J Plant Biol. 2008;51:341–6.
- Paszkiewicz G, Gualberto JM, Benamar A, Macherel D, Logan DC. Arabidopsis seed mitochondria are bioenergetically active immediately upon imbibition and specialize via biogenesis in preparation for autotrophic growth. Plant Cell. 2017;29:109–28.
- Doehlert DC, Kuo TM, Felker FC. Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize. Plant Physiol. 1988;86:1013–9.
- Alonso AP, Dale VL, Shachar-Hill Y. Understanding fatty acid synthesis in developing maize embryos using metabolic flux analysis. Metab Eng. 2010; 12:488–97.
- Troncoso-Ponce MA, Rivoal J, Dorion S, Moisan MC, Garcés R, Martínez-Force E. Cloning, biochemical characterization and expression of a sunflower (*Helianthus annuus* L) hexokinase associated with seed storage compounds accumulation. J Plant Physiol. 2011;168:299–308.

- Lunn G, Madsen E. ATP-levels of germinating seeds in relation to vigor. Physiol Plantarum. 1981;53(2):164–9 doi.org/10.1111/j.1399-3054.1981.tb04127x.
- Moreland DE, Hussey GG, Shriner CR, Farmer FS. Adenosine phosphates in germinating radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. Plant Physiol. 1974;54(4): 560–3.
- Xu HH, Liu SJ, Song SH, Wang RX, Wang WQ, Song SQ. Proteomics analysis reveals distinct involvement of embryo and endosperm proteins during seed germination in dormant and non-dormant rice seeds. Plant Physiol Biochem. 2016;103:219–42.
- Sosso D, Luo D, Li QB, Sasse J, Yang J, Gendrot G, Suzuki M, Koch KE, McCarty DR, Chourey PS, Rogowsky PM, Ross-Ibarra J, Yang B, Frommer WB. Seed filling in domesticated maize and rice depends on SWEET-mediated hexose transport. Nat Genet. 2015;47:1489–93.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; procedure and some application. PNAS. 1979;76:4350–4.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;254:248–54.
- Loqué D, Lalonde S, Looger LL, von Wirén N, Frommer WB. A cytosolic transactivation domain essential for ammonium uptake. Nature. 2007;446:195–8.
- Gietz RD. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. In: Smith J, Burke D, editors. Yeast Genetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol. 1205. New York, NY: Humana Press; 2014. p. 1–12.
- Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, et al. Gatewaycompatible vectors for plant functional genomics and proteomics. Plant J. 2006;45:616–29.
- Yoo S-D, Cho Y-H, Sheen J. (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. Nat Protoc. 2007; 2:1565–72.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions





Information Fig S1 and Table S1.

To represent the evolutionary relation among the plant HXKs presented in the Fig S1, the evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the JTT matrix-based model using 2000 bootstrap [29, 30, 31]. The tree with the highest log likelihood (-40548.09) is shown. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using a JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 114 amino acid sequences. There was a total of 807 positions in the final dataset.

All amino acid sequences were aligned using MEGA X [29]. Group designations were made from visual inspection of apparent clusters and according to literature information. The amino acids sequences were obtained from Uniprot¹ (https://www.uniprot.org/uniprot The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase. Nucleic Acids Res. 2017;45:D158-9), PLAZA² (https://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/), EnsemblPlants³ (http://plants.ensembl.org/index.html) and NCBI⁴ (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/), for the following species:

Sc: Saccharomyces cerevisiae; Mp: Marchantia polymorpha; Pp: Physcomitrella patens; Sm: Selaginella moellendorffii; Hv: Hordeum vulgare; Os: Oryza sativa ssp japonica; Sb: Sorghum bicolor; Zm: Zea mays; Ta: Triticum aestivum; At: Arabidopsis thaliana; Vv: Vitis vinifera; Sl: Solanum lycopersicum; St: Solanum tuberosum; Mt: Medicago truncatula; Nt: Nicotiana tabacum. The gene and ID number of the analyzed sequences are in Table S1.



Fig S1. Molecular phylogenetic analysis for plant HXKs.

Gene Name	ID number	Gene Name	ID number
	Saccharon	nyces cerevisiae	
ScHXK1	P04806 ¹	ScHXK2	P04807 ¹
	Marchan	tia polymorpha	
MpHXK1	Mapoly0022s0069 ²	MpHXK2	Mapoly0056s0008 ¹
	Physcon	nitrella patens	
PpHXK1	Pp3c14_6150 ²	PpHXK2	Pp3c19_20120 ²
РрНХКЗ	Pp3c21_19280 ²	PpHXK4	Pp3c1_5000 ²
PpHXK5	Pp3c2_11350 ²	РрНХКб	Pp3c10_8650 ²
PpHXK7	Pp3c22_9450 ²	PpHXK8	Pp3c18_12510 ²
РрНХК9	Pp3c8_18980 ²	PpHXK10	Pp3c23_970 ²
PpHXK11	Pp3c15_12840 ²		
	Selaginella	a moellendorffii	
SmHXK1	SMO134G0275 ²	SmHXK2	SMO147G0324 ²
SmHXK3	SMO141G0303 ²	SmHXK5	SMO230G0110 ²
	Horde	um vulgare	
HvHXK3	HVU0038G3254 ²	HvHXK5	HVU0036G1776 ²
НvНXК6	HVU0038G0500 ²	HvHXK7	HVU0036G2577 ²
HvHXK8	HVU0038G2059 ²	HvHXK9	HVU0038G2827 ²
HvHXK10	HVU0036G1944 ²		
	Oryza sati	va ssp japonica	
OsHXK1	OS07G0446800 ³	OsHXK2	XP_015637797 ⁴
OsHXK3	XP_015621344 ⁴	OsHXK4	XP_015645316 ⁴
OsHXK5	OS05G0522500 ³	OsHXK6	OS01G0742500 ³
OsHXK7	OS05G0187100 ³	OsHXK8	OS01G0190400 ³
OsHXK9	XP_015614778 ⁴	OsHXK10	OS05G0375100 ³
	Sorgh	um bicolor	
SbHXK1	Sobic.003G035500 ²	SbHXK2	Sobic.003G280400 ²

Table S1. ID numbers of the HXK gene families used for the phylogenetic analysis.

SbHXK3	Sobic.003G421201 ²	SbHXK5	Sobic.009G203500 ²
SbHXK6	Sobic.003G291800 ²	SbHXK7	Sobic.009G069800 ²
SbHXK10	Sobic.009G119100 ²		
	Zea	n mays	
ZmHXK3a	GRMZM2G068913 ³	ZmHXK3b	GRMZM2G467069 ³
ZmHXK4	GRMZM2G058745 ³	ZmHXK5	GRMZM2G432801 ³
ZmHXK6	GRMZM5G856653 ³	ZmHXK7	GRMZM2G051806 ³
ZmHXK8	GRMZM2G104081 ³	ZmHXK9	GRMZM2G171373 ³
ZmHXK10	GRMZM2G046686 ³		
	Triticum	n aestivum	
TaHXK1	TAE02953G001 ²	TaHXK2	TAE54883G001 ²
TaHXK3	TAE52226G001 ²	TaHXK4	TAE05512G002 ²
TaHXK5	TAE56610G005 ²	TaHXK6	TAE57032G006 ²
TaHXK7	TAE37995G004 ²	TaHXK8	TAE47638G004 ²
TaHXK9	TAE40692G004 ²	TaHXK10	TAE57619G001 ²
TaHXK11	TAE13066G003 ²	TaHXK12	TAE40850G002 ²
TaHXK13	TAE40826G003 ²	TaHXK14	TAE19797G001 ²
TaHXK15	TAE41439G002 ²	TaHXK16	TAE21658G002 ²
TaHXK17	TAE05962G003 ²	TaHXK18	TAE02025G001 ²
TaHXK19	TAE30281G001 ²	TaHXK20	TAE51630G001 ²
TaHXK21	TAE08161G001 ²	TaHXK22	TAE51140G001 ²
TaHXK23	TAE53374G005 ²	TaHXK24	TAE08078G001 ²
TaHXK25	TAE49603G001 ²	TaHXK26	TAE51566G002 ²
	Arabidop	sis thaliana	
AtHXK1	AT4G29130 ³	AtHXK2	AT2G19860 ³
AtHXK3	AT1G47840 ³	AtHKL1	AT1G50460 ³
AtHKL2	AT3G20040 ³	AHKL3	AT4G37840 ³
	Vitis	vinifera	
VvHXK1	GSVIVG01015297001 ²	VvHXK2	GSVIVG01016971001 ²
VvHXK3	GSVIVG01009899001 ²	VvHKL1	GSVIVG01031551001 ²

VvHKL2	GSVIVG01002667001 ²						
	Solanum lycopersicum						
SlHXK1	Solyc03g121070.2 ²	SlHXK2	Solyc06g066440.2 ²				
SlHXK3	Solyc12g008510.1 ²	SlHXK4	Solyc04g081400.2 ²				
SlHXK5	Solyc11g065220.1 ²	SlHXK6	Solyc02g091830.2 ²				
	Solanum tuberosum						
StHXK1	PGSC0003DMG400002525 ²	StHXK2	PGSC0003DMG400016521 ²				
StHXK3	PGSC0003DMG400000295 ²	StHXK4	PGSC0003DMG400009861 ²				
StHXK5	PGSC0003DMG400013187 ²	StHXK6	PGSC0003DMG400030624 ²				
	Medicago t	truncatula					
MtHXK1	Medtr8g102460 ²	MtHXK2	Medtr6g088795 ²				
MtHXK3	Medtr8g014530 ²	MtHXK4	Medtr1g025140 ²				
MtHKL1	Medtr5g009000 ²	MtHKL2	Medtr4g097900 ²				
	Nicotiana tabacum						
NtHXK1	AAS60195 ¹	NtHXK2	AAS60197 ¹				
NtHXK3	Q6Q8A5 ¹	NtHXK4	AAT77515 ¹				
NtHXK5	AAS60192 ¹	NtHXK6	AAS60194 ¹				
NtHKL1	AAS60198 ¹						

Domain/	AtHXK1	ZmHXK								
Residue	AIIIANI	3 a	3b	4	5	6	7	8	9	10
	L 100	<u>I 100</u>	<u>I 100</u>	L 109	L 109	L 109	L 70	L 72	L 107	<u>V 102</u>
	L 102	L 102	L 102	L 111	L 111	L 111	L 72	L 74	L 109	L 104
	L 143	L 141	L 141	L 152	L 152	L 152	L 113	L 115	L 150	L 144
	I 147	<u>V 145</u>	<u>V 145</u>	I 156	I 156	I 156	I 117	I 119	I 154	I 148
	L 151	L 149	L 149	L 160	L 160	L 160	L 121	L 123	L 158	L 152
Hydrophobic	V 155	V 153	V 153	V 164	V 164	V 164	V 125	V 127	<u>I 162</u>	<u>I 156</u>
channel	L 172	L 165	L 165	L 181	L 181	L 181	L 138	I 144	L 179	L 168
	F 174	F 167	F 167	F 183	F 183	F 183	F 140	F 146	F 181	F 170
	F 176	F 169	F 169	F 185	F 185	F 185	F 141	F 148	F 183	F 172
	F 197	F 190	F 190	F 206	F 206	F 206	F 163	F 169	F 204	F 193
	L 211	L 204	L 204	L 220	L 220	L 220	L 177	L 183	L 218	L 207
	L 215	L 208	L 208	<u>M 224</u>	<u>M 224</u>	<u>M 224</u>	<u>M 181</u>	<u>M 187</u>	<u>I 222</u>	L 211
Catalytic	K 195	K 188	K 188	K 204	K 204	K 204	K 161	K 167	K 202	K 191
residues	D 230	D 223	D 223	D 239	D 239	D 239	D 196	D 202	D 237	<u>N 226</u>
	T 194	T 187	N 187	T 203	T 203	T 203	T 160	T 166	T 201	T 190
	K 195	K 188	K 188	K 204	K 204	K 204	K 161	K 167	K 202	K 191
	N 229	N 222	N 222	N 238	N 238	N 238	N 195	N 201	N 235	N 225
Glucose	D 230	D 223	D 223	D 239	D 239	D 239	D 196	D 202	D 236	N 226
contacts	S 177	S 170	S 170	S 186	S 186	S 186	S 143	S 149	S 184	S 173
	N 256	N 249	N 249	N 265	N 265	N 265	N 222	N 228	N 263	N 252
	E 284	E 277	E 277	E 293	E 293	E 293	E 253	E 256	E 291	E 281
	E 315	E 308	E 308	E 324	E 324	E 324	E 284	E 287	E 322	E 312

Table S2. Comparison of conserved amino acids at catalytic and substrate binding domains between ZmHXKs with AtHXK1 [32]. The amino acid changes are in bold.

	-	_								
	G 104	G 104	G 104	G 113	G 113	G 113	G 74	G 76	G 111	G 106
	T 105	T 105	T 105	T 114	T 114	T 114	Т 75	Т 77	T 112	T 107
	N 106	N 106	N 106	N 114	N 114	N 114	N 76	N 78	N 113	S 108
	S 177	S 170	S 170	S 186	S 186	S 186	S 143	S 149	S 184	S 173
	K 195	K 188	K 188	K 204	K 204	K 204	K 161	K 167	K 202	K 191
ATP	D 230	D 223	D 223	D 239	D 239	D 239	D 196	D 202	D 236	N 226
interaction	T 253	<u>A 246</u>	<u>A 246</u>	T 262	T 262	T 262	T 219	T 225	T 260	A 249
	G 254	G 247	G 247	G 263	G 263	G 263	G 220	G 226	G 261	G 250
	D 439	E 438	E 438	D 450	D 450	D 449	D 406	D 409	D 445	E 444
	G 440	G 439	G 439	G 451	G 451	G 450	G 407	G 410	G 446	G 445
	G 441	G 440	G 440	G 452	G 452	G 451	G 408	G 411	G 447	G 446
	S 478	S 477	S 477	S 489	S 489	S 486	S 445	S 448	S 484	S 483
	G 91	G 91	G 91	G 100	G 100	G 100	G 61	G 63	G 98	G 93
	G 95	G 95	G 95	G 104	G 104	G 104	G 65	G 67	G 102	G 97
	G 103	G 103	G 103	G 112	G 112	G 112	G 73	G 75	G 110	G 105
	G 173	G 166	G 166	G 182	G 182	G 182	G 139	G 145	G 180	G 169
Conserved	G 252	G 245	G 245	G 261	G 261	G 261	G 218	G 224	G 259	G 248
Glycine	G 254	G 247	G 247	G 263	G 263	G 263	G 220	G 226	G 261	G 250
	G 310	N 303	N 303	G 319	G 319	G 319	G 279	G 282	D 317	Y 307
	G 320	G 313	G 313	G 329	G 329	G 329	G 289	G 292	G 327	G 317
	G 440	G 439	G 439	G 451	G 451	G 450	G 407	G 410	G 446	G 445
	G 479	G 478	G 478	G 490	G 490	G 489	G 446	G 449	G 485	V 484



Fig S2. SDS-PAGE of full versions of recombinant ZmHXKs. Purification process of recombinant: (**A**) ZmHXK4, (**B**) ZmHXK5, (**C**) ZmHXK6, (**D**) ZmHXK7, and (**E**) ZmHXK8. St: Molecular weight standard, P: Pellet clarified with urea, S: Soluble supernatant, U: Unbound, W: Wash, E_X: Elution.



Fig S3. Purification of truncated versions of recombinant ZmHXKs. Purification process of recombinant: **(A)** ZmHXK4 Δ 30, **(B)** ZmHXK5 Δ 30, **(C)** ZmHXK6 Δ 30 and **(D)** ZmHXK9 Δ 30. All fractions were separated by SDS-PAGE and stained with Coomasie blue. **(E)** Western Blot of full and truncated versions of ZmHXK4-6. The proteins were detected using anti-V5-HRP. St: Molecular weight standard, T: Total cell extract S: Soluble supernatant, U: Unbound, W: Wash, E_x: Elution.



Fig S4. Inhibitory effects of ADP, NAG and G6P on ZmHXKs. (**A**, **B**, **C**) ZmHXKΔ4, (**D**, **E**, **F**) ZmHXKΔ5, (**G**, **H**, **I**) ZmHXKΔ6, (**J**, **K**, **L**) ZmHXK7, and (**M**, **N**, **O**) ZmHXK8.



Fig S5. Expression profile of full and truncated versions of ZmHXKs in the JT 20088 yeast mutant. St: Molecular weight standard.

Protein	Transmembrane domain	Transit peptide	Subcellular localization
ZmHXK3a	No	5-25	Mitochondrion
ZmHXK3b	No	5-25	Mitochondrion
ZmHXK4	4-24	No	Secretory pathway
ZmHXK5	4-24	No	Secretory pathway
ZmHXK6	9-29	No	Secretory pathway
ZmHXK7	No	No	Other
ZmHXK8	No	No	Chloroplast
ZmHXK9	4-24	No	Secretory pathway
ZmHXK10	6-26, 339-359	No	Secretory pathway

Table S3. Subcellular prediction of ZmHXKs.

The prediction of transmembrane domains and transit peptide was made with the full amino acid sequence of each HXK with the aid of Toppred 1.10 software. The first 60 amino acids of each HXK protein sequence was used to predict the subcellular localization with the TargetP 1.1 software [32].



Fig S6. Evaluation of cytosolic and mitochondrial purity using specific antibodies. The purity of the cytosolic (Cyt), mitochondrial washed (wMit) and mitochondrial Percoll purified (pMit) fractions (10 μ g) was evaluated by Western blot using Agrisera (Vännäs, Sweden) antibodies. These are representative membranes of at least three replicates.

Insertion in 7mHXK9		IXK9	Hydroph	obic channel	Conserved Gly
	(75-76)		V ¹⁵⁵	L ²¹⁵	G ³¹⁰
	(13-10)		- +		DCEOT
AtHXK1	GG	5	RVLLG	ALERV	DCEOT
AtHXK2	GG \$	5	RVLLG	AMERV	DCEUL
AtHXK3	GG (G	SVQLG	AMEAH	PGERL
AtHKL1	GG \$	5	RVLLG	ALNRR	ANDMG
AtHKL2	GG \$	S	KVHL G	ALN <mark>KR</mark>	SNDMG
AtHKL3	CC (G	RGTLG	SLETH	PGHKI
OsHXK1	GGS	S	RVRLA	AMSER	PGEQT
OsHXK2	GG	5	RVQLG	ALERQ	PGEQV
OsHXK3	GG	S	RVQVG	ALANC	RNDQG
OsHXK4	GA (G	RVQLG	AMERQ	PGEQI
OsHXK5	SH	A	RVQLG	AMERQ	PGEQI
OsHXK6	PH 2	A	RVQLG	AMERQ	PGEQI
OsHXK7	GGS	-	RVQLA	AMEKQ	PGEQI
OsHXK8	GGS	-	KVHLG	AMVKQ	PGEQI
OsHXK9	GG	S	RVQLG	AIRSQ	PGKQV
OsHXK10	GG	5	KVELG	ALARN	YYDQG
ZmHXK3a	GG	S	KVEVG	ALARS	RNDQG
ZmHXK3b	GG	5	RVEVG	ALARN	RNDQG
ZmHXK4	IH	A	RVQLG	AMERQ	PGEQI
ZmHXK5	IH 2	A	RVKLG	AMERQ	PGEQI
ZmHXK6	PH	A	RVOLG	AMERQ	PGEQI
ZmHXK7	GGS	-	RVOLA	AMEKQ	PGEQI
ZmHXK8	GGS	-	KVOLG	AMEKO	PGEQI
ZmHXK9	DSEGDSGSS	7	RIOFG	AIKRO	PDEQI
ZmHXK10	GA 8	5	KLELG	ALVRN	QYDQA

Fig S7. Changes in the amino acids of ZmHXK9 that could explain its low activity. The sequences were aligned using SeaView 4 [32].

	qPCR primers
ZmHXK4-RT-Fw	GTGATCGAGGAGGTCGAGAG
ZmHXK4-RT-Rv	AACAGCCCATGTTCATCTCC
ZmHXK5-RT-Fw	GTGTGCTGCGAGTCCAACTA
ZmHXK5-RT-Rv	GGAAGGAAAACGTGAAACCA
ZmHXK6-RT-Fw	CATTGCTGCTGAGTTGGAAA
ZmHXK6-RT-Rv	CTTTCCATGGCCCTACTCAA
ZmHXK7-RT-Fw	CTGGTTTCGGGCATGTATCT
ZmHXK7-RT-Rv	GACCACCATCTTCCTCGTGT
ZmHXK8-RT-Fw	TGCTCCTCCTACGTCGAT
ZmHXK8-RT-Rv	GCCGACTTCTCTGGAGTCAC
ZmHXK9-RT-Fw	TTCAGTTGCATCTGGCACTC
ZmHXK9-RT-Rv	CATATCTCCCAGCAGCCAAT

Table S4. List of primers used for qPCR analysis, subcloning each maize HXK and PCR analysis in the yeast mutant.

Subcloning primers and adapters

(Bases necessary for recombination and not present in original template are underlined)

AtHXK1-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGGTAAAGT AGCTGTTGGAG
AtHXK1-GW-Rv	AGAAAGCTGGGTGAGAGTCTTCAAGGTAGAGAGAGTG
ZmHXK4-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGTGAAGGC CGTGGTGGT
ZmHXK4-GW-Rv	AGAAAGCTGGGTGGTCACTCGCGCCATACTGATACTG
ZmHXK5-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGGGAAGTC CGTGGTGGT
ZmHXK5-GW-Rv	AGAAAGCTGGGTGGTCACTCTCGCCATACTGGGAGT
ZmHXK6-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGCGAAGG GCGGTGCGGT
ZmHXK6-GW-Rv	AGAAAGCTGGGTGTGCAGCTTCAGCATACTGGGAGTGC
ZmHXK7-GW-Fw	AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGTGGCGGC GGCGGAC
ZmHXK7-GW-Rv	AGAAAGCTGGGTGGTACTGCGAGTGGGCAGCTGCAA

AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGCGGCAGC TGCGCTGG
AGAAAGCTGGGTGCTGAGATTGCGAGGCAGCAATCAGGG
AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGCGGAAGCC GGCGGCACT
AGAAAGCTGGGTGATCATCCACGGCCTGGAGACGTTG
AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGACGCCGA CCTCCTGGGG
AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGACGCCGC GCTCCTGGG
AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGAGGAGGA GTCGGCGGCGG
AAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGCGAGGC GATGGGCACGC

Primers for the PCR analysis in the yeast mutant

		Size (bp)
ZmHXK4-Fw	CACGGTTGGTGAAGATGTTG	480
ZmHXK4-Rv	TGACATATCTGGCGTCCTCA	
ZmHXK5-Fw	CACGGTTGGTGAAGATGTTG	480
ZmHXK5-Rv	TGACATATCTGGCGTCCTCA	
ZmHXK6-RT-Fw	GGGACTCTAATTAAGTGGACCAAAG	147
ZmHXK6-RT-Rv	AGCCAATGTGCCTACAGTATC	
ZmHXK7-RT-Fw	GCTGTTGGTGAGGATGTCG	130
ZmHXK7-RT-Rv	CGTCCTCATCGTTGTACCG	
ZmHXK8-RT-Fw	TCTCCTACGTCGATAAGCTCC	180
ZmHXK8-RT-Rv	GAATGCCGACTTCTCTGGAG	
ZmHXK9-RT-Fw	GAAATTGTCCGAAGGGTCTTG	137
ZmHXK9-RT-Rv	TCAGGCGATGTGTCTTGATG	

Plant Hexokinases are Multifaceted Proteins

G. Paulina Aguilera-Alvarado and Sobeida Sánchez-Nieto*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Conjunto E. Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Coyoacán, México 04510, DF, México

*Corresponding author: E-mail, sobeida@unam.mx; Fax: +52-55565329. (Received November 30, 2016; Accepted April 19, 2017)

Sugars are the main carbon and energy source in cells, but they can also act as signaling molecules that affect the whole plant life cycle. Certain tissues can produce sugars and supply them to others, and this plant tissue heterogeneity makes sugar signaling a highly complex process that requires elements capable of perceiving changes in sugar concentrations among different tissues, cell compartments and developmental stages. In plants, the regulatory effects of glucose (Glc) have been the most studied to date. The first Glc sensor identified in plants was hexokinase (HXK), which is currently recognized as a dual-function protein. In addition to its catalytic activity, this enzyme can also repress the expression of some photosynthetic genes in response to high internal Glc concentrations. Additionally, the catalytic activity of HXKs has a profound impact on cell metabolism and other sugar signaling pathways that depend on phosphorylated hexoses and intermediate glycolytic products. HXKs are the only proteins that are able to phosphorylate Glc in plants, since no evidence has been provided to date concerning the existence of a glucokinase. Moreover, the intracellular localization of HXKs seems to be crucial to their activity and sensor functions. Recently, two new and surprising functions have been described for HXKs. In this review, we discuss the versatility of HXKs in regard to their catalytic and glucose sensor activities, intracellular location, protein-protein and hormone interactions, as well as how these HXK characteristics influence plant growth and development, in an effort to understand this enzyme's role in improving plant productivity.

Keywords: Metabolic hexokinase • Plant hexokinase • Sugarresponsive genes • Sugar sensing.

Abbreviations: AUX, auxin; BR, brassinosteoid; 2DOG, 2deoxyglucose; Fruc, fructose; gin2-1, Arabidopsis mutant insensitive to glucose deficiency in AtHXK1 protein Glc, glucose; G6P, glucose-6-phosphate; HXK, hexokinase; HXL, Hexokinase-Like; Man, mannose; OPPP, oxidative pentose phosphate pathway; PCD, programmed cell death; ROS, reactive oxygen species; Suc, sucrose; TOR, target of rapamycin.

Introduction

Sugars play an important role during plant life, not only as the main carbon and energy source but also as signaling molecules.

The ability of plants to produce their own sugars is confined to photosynthetic tissues, whereas other tissues act as a sink. This tissue heterogeneity makes sugar signaling a very complex activity that requires elements that can perceive changes in sugar concentrations within different tissues, cell compartments and developmental stages. Glucose (Glc) is the main carbon and energy source preferred by most organisms, and it is the most studied sugar in plants due to the regulatory effects produced in the whole plant life cycle (Rolland et al. 2006, Ramon et al. 2008, Sheen 2014).

Through many pharmacological assays and global transcriptomic analyses, it has been demonstrated that >2,000 plant genes are regulated by Glc (Sheen 1990, Graham et al. 1994, Jang and Sheen 1994, Xiao et al. 2000, Price et al. 2004, Villadsen and Smith 2004, Xiong et al. 2013). Some of the genes are regulated by sugar sensing in the absence of metabolism, and Glc analogs are typically used to find these genes. Currently with global transcriptomic analysis, it is possible to find more Glc-responsive genes. However, there is only one report that combined Glc analogs and transcriptomic analysis. The authors carried out three separate treatments, Glc, 3-O-methylglucose (3OMG) and 6-deoxyglucose (6DOG); both analogs are imported by the cell but undergo low or no further metabolism (Fig. 1). The authors did not find any gene that changes its expression with all the three treatments, so a possible explanation is that such analogs were not perceived as a sugar signal (Villadsen and Smith 2004). Also, the phosphorylation of 30MG by hexokinase (HXK) is negligible (Cortès et al. 2003), so some authors have used this analog as an osmotic control (Price et al. 2004). Nevertheless, the lack of an effect on gene expression indicates that Glc uptake is insufficient to yield an intracellular signal (Price et al. 2004); however, other elements are required to transfer sugar information, such as HXK, the first Glc sensor identified in plants.

HXKs can regulate glycolytic flux and can supply substrates to several pathways, such as the oxidative pentose phosphate pathway (OPPP), starch synthesis, fatty acid synthesis and sugar nucleotide formation (Claeyssen and Rivoal 2007). Glc and its derivate metabolites can also influence the plant's development, affecting the transcription of some genes through the glycolytic or metabolic sensing pathway that relies on HXK's hexose-phosphorylating function (**Fig. 1**). In addition, it has been shown that, apart from HXK's catalytic activity, it also acts as a Glc sensor that regulates the gene expression of central

Plant Cell Physiol. 0(0): 1-10 doi:10.1093/pcp/pcx062, available online at www.pcp.oxfordjournals.org

[©] The Author 2017. Published by Oxford University Press on behalf of Japanese Society of Plant Physiologists.

All rights reserved. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com

C.P.Aguilera-Alvarado and S.Sánchez-Nieto | Metabolic and sensor activities of the plant HXKs



Fig. 1 Non-metabolizable glucose analogs are used to discriminate between hexokinase-dependent and glycolytic signaling pathways.

cellular components and secondary metabolism through the HXK-dependent signaling pathway (Jang et al. 1997, Moore et al. 2003, Y. H. Cho et al. 2006, Rolland et al. 2006, Ramon et al. 2008, Cho et al. 2009).

HXK belongs to a multigene family (Table 1) that comprises six members in Arabidopsis thaliana, 10 in Oryza sativa, four in Solanum lycopersicum, nine in Nicotiana tabacum and nine in Zea mays (J.-I. Cho et al. 2006, Damari-Weissler et al. 2006, Kandel-Kfir et al. 2006, Karve et al. 2008, Karve et al. 2010, Kim et al. 2013, Zhang et al. 2014). However, a limited number of members of each HXK family have been characterized (Table 1), particularly in A. thaliana, where three HXKs are catalytic (AtHXK1, AtHXK2 and AtHXK3) and three are structurally related, but catalytically inactive proteins named Hexokinase-Like (HXL) (AtHXL1, AtHXL2 and AtHXL3). Only three of these proteins, which have different subcellular locations, are sensors: AtHXK1, AtHXK3 and AtHXL1. AtHXK3 is located at the plastid, while AtHXK1 and AtHKL1 are found in the mitochondria, and AtHXK1 can even migrate to the nucleus (Moore et al. 2003, Cho et al. 2006, Balasubramanian et al. 2007, Karve et al. 2008, Karve et al. 2010, Zhang et al. 2010). It is tempting to speculate that HXKs are so diverse because some members may function essentially as metabolic drivers and others mainly act as Glc sensors (Sheen 2014). This review will focus on describing HXK's versatility, in regard to its catalytic and Glc sensor activities, intracellular locations and hormone-HXK signaling interactions, aiming to integrate these HXK characteristics that influence plant growth and development as a means to understand its potential role in improving plant productivity.

HXK in the Glc Signaling Pathways

Treatments with Glc and its negative effects on the glyoxylate cycle and photosynthetic gene expression were the first experimental evidence that suggested HXK's regulatory role in plants (Sheen 1990, Graham et al. 1994). Subsequently, using non-metabolizable Glc analogs such as 2-deoxyglucose (2DOG) and

mannose (Man), both of which are transported into the cell and phosphorylated by HXK but are poorly metabolized, allowed researchers to distinguish between the HXK-dependent sugar-sensing pathway and the glycolytic pathway (Fig. 1). Further evidence that differentiates both pathways was the complementation assay developed by Jen Sheen's group. They generated catalytically inactive AtHXK1 proteins that were capable of binding Glc and transducing the Glc status signal, but failed to produce glucose-6-phosphate (G6P). When these HXK mutants were expressed in the A. thaliana mutant gin2-1, a plant that is insensitive to high Glc concentrations due to a defective mutation in AtHXK1, plant sensitivity to Glc was restored. This demonstrated for the first time that a plant HXK, specifically AtHXK1, is a sensor protein in which HXK's catalytic activity is non-essential to sensing Glc (Moore et al. 2003). In spite of that result, non-metabolizable analogs or HXK competitive inhibitors that demonstrate HXK sensor function are still used due to the difficulty of obtaining mutants or performing complementation assays in other plants besides A. thaliana. However, new technologies, such as CRISPR-Cas/9, will allow genetic approaches in other models, for instance in crops and legumes (Ma et al. 2016).

On the other hand, there are other ways that HXK affects plant development. HXKs with catalytic activity could account for metabolite production and, as a consequence, they can alter plant physiology; however, there is also a sugar sensor pathway that depends on Glc metabolism, namely the glycolytic pathway. The next sections will focus on describing the main aspects of two glucose signaling pathways, one that is highly dependent on the sensor capacity of HXK and another that requires hexose phosphorylation activity.

The HXK-dependent pathway

Plants experience catabolic and anabolic gene repression via a sugar signaling pathway that depends on HXK's sensor function (Sheen 1990, Graham et al. 1994, Jang et al. 1997). In cucumber, for instance, Glc, 2DOG and Man induce a severe reduction in the malate synthase (MS) and isocitrate lyase (ICL) genes, both



Species	Family members	Subcellular location/HXK type	Biochemical properties	Glc sensor HXK	References
Arabidopsis thaliana	AtHXK1 AtHXK2 AtHXK3 AtHKL1 AtHKL2 AtHKL3	Type A: AtHXK3 Type B: AtHXK1 AtHXK2, AtHKL1, AtHKL2 and AtHKL3 Other: AtHXK1 trans- locates to the nucleus.	AtHXK1: K_m Glc 89 μ M, K_m Fru 17 mM, K_m ATP 9.4 μ M. AtHXK3: K_{mapp} Glc 61 μ M, K_{mapp} Man 85 μ M, K_{mapp} Fru 17 mM. AtHKL1, AtHKL2 and AtHKL3 are catalytic- ally inactive	AtHXK1, AtHXK3 and AtHKL1.	Dai et al. (1999); Moore et al. (2003); Yanagisawa et al. (2003); Y. H. Cho et al. (2006); Zhang et al. (2010); Karve et al. (2012); Feng et al. (2015).
Nicotiana tabacum	NtHXK1 NtHXK1a NtHXK2 NtHXK3 NtHXK4a NtHXK4b NtHXK5 NtHXK7 NtHKL1	Type A: NtHXK2 Type B: NtHXK1, NtHXK1a ^a , NtHXK3 ^a , NtHXK4a ^a , NtHXK4b ^a , NtHXK5 ^a , NtHXK6 ^a , NtHXK7 ^a and NtHKL1 ^a .	NtHXK2: K_m Glc 53 μ M, K_m Man 96 M, K_m Fru 14 mM NtHXKL1 is catalytic- ally inactive ^a .	NtHXK1 is able to comple- ment the gin2- 1 mutant, but in tobacco its sensor function has not been proved.	Giese et al. (2005); Karve et al. (2010); Kim et al. (2013)
Oryza sativa	OsHXK1 OsHXK2 OsHXK3 OsHXK4 OsHXK5 OsHXK6 OsHXK7 OsHXK8 OsHXK9 OsHXK10	Type A: OsHXK4 Type B: OsHXK2, OsHXK3, OsHXK5, OsHXK6, OsHXK9 and OsHXK10. Type C: OsHXK1, OsHXK7 and OsHXK8 Other: OsHXK5 and OsHXK6 translocate to the nucleus.	OsHXK5: K_m Glc 190 μ M OsHXK6: K_m Glc 200 μ M OsHXK3 and OsHXK10 are catalyt- ically inactive ^a .	OsHXK5, OsHXK6 and OsHXK7 are able to com- plement gin2-1 and also have a role in de- velopment of rice plant.	JI. Cho et al. (2006, 2009); Aki and Yanagisawa (2009); Karve et al. (2010); Cheng et al. (2011); Kano et al. (2013); Kim et al. (2016)
Physcomitrella patens	PpHXK1 PpHXK2 PpHXK3 PpHXK4 PpHXK5 PpHXK6 PpHXK7 PpHXK8 PpHXK9 PpHXK10 PpHXK11	Type A: PpHXK1, PpHXK5, PpHXK6 Type B: PpHXK2, PpHXK3, PpHXK7 and PpHXK8 Type C: PpHXK4 Type D: PpHXK9, PpHXK10 and PpHXK11 Other: PpHXK4 in nucleus.	PpHXK1 is unable to com- plement HXK deficiency in yeast. In moss, it rep- resents 80% of HXK total activity.	Not characterized.	Olsson et al. (2003); Nilsson et al. (2011)
Solanum lycopersicum	SIHXK1 SIHXK2 SIHXK3 SIHXK4	Type A: SIHXK4 Type B: SIHXK1, SIHXK2 and SIHXK3	SIHXK3: K _m Glc 24 μM, K _m Fru 3.2 mM SIHXK4: K _m Glc 38 μM, K _m Fru 2.3 mM	Not characterized.	Kandel-Kfir et al. (2006); Damari- Weissler et al. (2006)
Solanum tuberosum	StHXK1 StHXK2	Not characterized, only has been suggested that they are anchored to membranes.	StHXK1: K _m Glc 33 μM, K _m Man 29 μM, K _m Fru 1.5 mM	StHXK1 and StHXK2 com- plement the gin2-1 mutant but in potato seem not to have sensor function.	Veramendi et al. (1999, 2002)

Table 1 Subcellular location, biochemical properties and Glc sensor HXK function of the family members in different plant species

(Continued)



Table 1 Continued

Species	Family members	Subcellular location/HXK type	Biochemical properties	Glc sensor HXK	References
Vitis vinifera	VvHXK1 VvHXK2 VvHXK3 VvHKL1 VvHKL2	Type A: VvHXK3 ^a Type B: VvHXK1 ^a VvHXK2 ^a VvHKL1 ^a and VvHKL2 ^a	VvHXK1: K _m Glu 32 μM, Man 60 μM, K _m Fru 119 mM. VvHXK2: K _m Glu 40 μM, K _m Man 86 μM, K _m Fru 26 mM. VvHKL1 ^a and VvHKL2 catalytically inactive.	Not characterized.	Karve et al. (2010); Yu et al. (2013)
Zea mays	ZmHXK3a ZmHXK3b ZmHXK4 ZmHXK5 ZmHXK6 ZmHXK7 ZmHXK8 ZmHXK9 ZmHXK10	Type B: ZmHXK3a ^a , ZmHXK3b ^a , ZmHXK4 ^a , ZmHXK5 ^a , ZmHXK6 ^a , ZmHXK9 ^a and ZmHXK10 ^a . Type C: ZmHXK7 ^a and ZmHXK8 ^a .	Soluble fraction: K_m Glu 49 μ M, K_m ATP 167 μ M. Submitochondrial fraction: K_m Glu 129 μ M, K_m ATP 156 μ M ZmHXK3a ^A , ZmHXK3b ^A and ZmHXK10 are catalyt- ically inactive	Not characterized	Galina et al. (1995); Karve et al. (2010); Zhang et al. (2014)

^a In silico prediction.

of which produce key metabolic enzymes in the glyoxylate cycle (Graham et al. 1994). In A. thaliana, rice and maize, an increase in soluble sugars represses the expression of some photosynthetic genes, such as Rubisco small subunit (RBCS), carbonic anhydrase (CAA), sedoheptulose bisphosphatase (SBP), Chl a/ b-binding protein (CAB) and a starch-degrading enzyme, α -amylase. There is a great deal of evidence that proves that HXK sensor activity mediates a reduction in the transcription of these genes (Sheen 1990, Jang et al. 1997, Moore et al. 2003, Y. H. Cho et al. 2006, J. -I. Cho et al. 2009) in order to circumvent the high energy expenditure related to constantly synthesizing these proteins. Consequently, it is common to evaluate the sensor function of an HXK by testing the repression of these photosynthetic genes at high Glc concentrations or through a complementation assay in the A. thaliana mutant gin2-1. To date, only the mechanism of CAB1 repression has been elucidated. This mechanism involves an atypical complex of three proteins: AtHXK1, the vacuolar H⁺-ATPase subunit B (VHA-B1) and the 19S regulatory particle of the proteasome (RPT5B). At high Glc concentration, the complex is found in the nucleus, but the mechanism of translocation is still not clear. In the nucleus, the complex binds to the promoter region of CAB1 to hinder its transcription (Y. H. Cho et al. 2006). As mentioned before, no evidence shows which mechanism regulates the transcription of other photosynthetic genes besides CAB1, but the said complex-or other HXK-bearing protein complexes-might be involved.

Another class of genes affected by the HXK-dependent pathway are sugar transporters. The expression of the triose phosphate translocator gene (*TTP*) from wheat, the hexose transporter gene (*VvHT1*) in grape and the monosaccharide transporter gene (*STP10*) in *A. thaliana* are repressed by the addition of Glc, 2DOG and Man. This repression is attenuated or eliminated when HXK competitive inhibitors are added or when HXK expression is reduced (Conde et al. 2006, Sun et al. 2006, Rottmann et al. 2016). Reduced expression of the sugar transporter might control Glc availability at a specific age, tissue or developmental stage, thus affecting plant physiology (Price et al. 2004).

Additionally, the HXK-dependent pathway not only generates gene repression but also induces gene expression. In *A. thaliana*, Glc is a positive regulator of the expression of transcription factor genes *MYB34*, *MYB51* and *MYB122*, and biosynthetic genes *CYP79B2* and *CYP83B1*. The latter are responsible for the biosynthesis of glucosinolates, which are secondary metabolites with wide biological functions, including stress resistance. The lack of induction and the glucosinolate deficiency found in Glc-treated *gin2-1* mutants revealed the positive role of HXK1 in the regulation of secondary metabolism (Miao et al. 2016).

In summary, HXK sensor function allows HXK to regulate the expression of a variety of genes. In spite of the considerable information about the Arabidopsis HXKs, until now there was not any property that could be used to predict the sensor function of a HXK; as mentioned previously, not all HXKs possess this role. So far, most of the described Glc HXK sensors have catalytic activity (Dai et al. 1999, Veramendi et al. 2002, Moore et al. 2003, Giegé et al. 2003, J. -I. Cho et al. 2009, Kano et al. 2013,



Kim et al. 2013; **Table 1**). The only exception is AtHXL1, whose overexpression makes plants insensitive to Glc, reduces seedling length and affects root morphology (Karve and Moore 2009). However, in this case, it has been proposed that low Glc affinity could be a strategy to arrest plant growth at high sugar concentrations (Karve and Moore 2009, Karve et al. 2012). Recently, analysis of the crystallographic structure of two HXKs, AtHXK1 and a catalytically inactive version, suggested that sensor function could be related to HXK's high affinity for Glc (Feng et al. 2015; **Table 1**). However, it is still not clear how the conformational movement induced by Glc binding in HXK propagates the Glc abundance signal. The crystal structure of the repressor complex may yield some insights. However, the question still remains of how many protein partners HXK has (besides VH5 and RTP5) to transduce the sugar signal.

The glycolytic pathway

Some genes are affected by the intermediate metabolites of the glycolytic pathway. For instance, it is known that genes PR1 and PR5 are induced during a pathogenic defense response. Similar results were obtained with Glc, fructose (Fru) and sucrose (Suc), indicating that this response is related to HXK activity and subsequent metabolism (Xiao et al. 2000). In A. thaliana, Suc and Glc are able to induce transcription of FCS-Like zinc finger (FLZ) genes FLZ1, FLZ2, FLZ8 and FLZ10-which are involved in biotic or abiotic stress regulation—as a response to Glc catabolism (Jamsheer and Laxmi 2015). In the same manner, some genes related to nitrate transport and metabolism are affected by this pathway. For example, non-metabolizable analogs and HXK inhibitors negatively affect the expression of the nitrate transporter family (NRT2.1, NRT2.4, NRT1.1 and NRT1.5) in A. thaliana, which is opposite to Glc addition, which induced their expression (Lejay et al. 2003, Lejay et al. 2008). Suc and Glc enhance the transcription of NIA1, a gene encoding nitrate reductase which is related to the production of G6P and fructose-6-phosphate (F6P) (Reda 2015). The effect of sugars on genes related to nitrogen metabolism or transport explains, in part, why limited or excess carbon availability impacts the use of nitrogen, affecting plant growth and productivity (Price et al. 2004).

Many experimental approaches demonstrated that Glc has a very potent effect that affects the expression of nearly all kinds of genes (>2,000), mainly those encoding transcription factors. Glc abundance is also perceived as a high nutrient and energy status, in which HXK affects not only the cell response but also the TOR (target of rapamycin) signaling pathway. The TOR pathway is induced by the metabolic intermediates of glycolysis, which indicates a connection with the hexose-phosphorylating activity of HXK and not with its sensor function (Price et al. 2004, Villadsen and Smith 2004, Xiong et al. 2013). A more detailed analysis would be necessary to elucidate the connection between Glc signaling by the glycolytic pathway (dependent on HXK activity) and the TOR pathway. For instance, analysis might include comparing the gene expression in a gin2-1 mutant and estradiol-inducible tor mutants in different tissues, or at different development stages or Glc concentrations, combined with pharmacological studies.

Subcellular Location and Metabolic Functions

Another relevant aspect related to plant HXKs is their intracellular localization, which could be a determinant of their physiological function in accordance with metabolic needs or Glc availability. Plants have four HXK types based on their subcellular localization; we will briefly describe each type and the ascribed metabolic functions.

Type A HXKs

Type A HXKs contain a hydrophobic sequence of 30 amino acids at the N-terminus that encodes a chloroplast signal. Chloroplast HXKs are found in the moss Physcomitrella patens and plants such as A. thaliana, N. tabacum, O. sativa, Spinacea oleracea, S. lycopersicum and Vitis vinifera (Olsson et al. 2003, J. -I. Cho et al. 2006, Kandel-Kfir et al. 2006, Karve et al. 2008, Karve et al. 2010, Nilsson et al. 2011). Because predictive methods did not identify type A HXK in maize or sorghum (C_4 plants), it has been proposed that this enzyme is only expressed in plants that tend to accumulate high starch content (Karve et al. 2010). The activity of chloroplastic HXK is suggested to be a key component for providing G6P to starch and fatty acid synthesis when night-time energy supply is limited in the chloroplast (Veramendi et al. 1999, Olsson et al. 2003, Giese et al. 2005, J. -H. Cho et al. 2006, Kandel-Kfir et al. 2006). On the other hand, the chloroplastic HXK of A. thaliana (AtHXK3) is also a Glc sensor that represses the expression of the light-harvesting Chl a/b (LHCB) gene (Karve et al. 2008, Zhang et al. 2010).

Type B HXKs

Type B HXKs have a highly hydrophobic helix formed by 24 amino acids that attaches the protein to the mitochondria. Some of these proteins are also translocated to the nucleus, but they have a nuclear translocation sequence adjacent to the membrane anchor domain (Cho et al. 2009). These are the most investigated HXKs, and multiple functions have been identified—some are sensors, some are metabolic enzymes. Mitochondrial HXK activity is distinguished from the other HXKs by its strong inhibition in the presence of ADP, N-acetylglucosamine and mannoheptulose (Galina et al. 1995, Yanagisawa et al. 2003, Y. H. Cho et al. 2006, Camacho-Pereira et al. 2009, Cheng et al. 2011). AtHXK1 and AtHXK2 are part of a glycolytic metabolon, and it has been suggested that its function is to reduce the diffusion of metabolites to other metabolic pathways for efficient ATP production (Graham et al. 2007). In Beta vulgaris, ATP channeling is proposed to occur at the expense of HXK activity located in the outer membrane of the mitochondria. HXK uses ATP that comes directly out of the mitochondria through the voltage-dependent anion channel (VDAC), a process that is coupled to ADP translocation in the opposite direction (into the mitochondrial matrix), to generate highly efficient respiration (Alcántar-Aguirre et al. 2013).

In regard to the physiological relevance of type B HXKs, these HXKs participate in events that lead to programmed cell death (PCD), but there have been conflicting results. In



Nicotiana benthamiana and S. tuberosum, HXK activity regulates H₂O₂ production, membrane potential and Cyt c release all events that trigger PCD-thus, HXK protects these plants from the deleterious process of reactive oxygen species (ROS) (Kim et al. 2006, Camacho-Pereira et al. 2009). In contrast, it has been recently reported that AtHXK1 stimulates PCD in leaves, as demonstrated in the Arabidopsis mutant mips1 that lacks myo-inositol-1-phosphate synthase. To elucidate the cause of this phenotype, mips1 mutants were screened for extragenic secondary mutations. Mutation T231I in HXK1 was identified to alter Glc binding, and it suppressed plant lesions in a manner that is dependent on HXK catalytic activity (Bruggeman et al. 2015). These results may indicate that HXK functions as a positive or negative modulator of PCD in plants. It is necessary to identify the mechanism by which HXK controls PCD in plants.

Plant productivity is greatly affected by pathogens. It has been demonstrated that overexpression of AtHXK1 and AtHXK2 in *N. benthamiana* increased the production of H_2O_2 and induced the expression of *PR* genes, resulting in plant resistance to the pathogen *Alternaria brassicicola* (Sarowar et al. 2008). In rice, the phosphorylation of D-allose by mitochondrial HXKs induces ROS accumulation and high *PR* gene expression, as well as increasing plant resistance to *Xanthomonas oryzae* infection (Kano et al. 2013).

Type C HXKs

Type C HXKs do not have signal peptides or a membrane anchor; they are cytosolic, and it seems that they are only present in monocotyledonous plants and the moss *P. patens* (Karve et al. 2010, Cheng et al. 2011, Nilsson et al. 2011). Cytosolic HXKs are insensitive to ADP inhibition (**Table 1**). It is suggested that they participate in the phosphorylation of Glc exported by the chloroplast, which results from starch degradation (Nilsson et al. 2011); this function might be vital for plants that lack Type A HXK. This type of HXK may also function in producing G6P to feed the OPPP for NADPH production (da-Silva et al. 2001, Chahtane et al. 2016).

In regard to sensor function, it has been demonstrated that OsHXK7, a Type C HXK, is also localized in the nucleus and displays a sensor function (Cheng et al. 2011, Kim et al. 2016). This discovery is relevant because all previously reported HXKs with sensor function are organellar HXKs, mostly mitochondrial proteins (**Table 1**) (Yanagisawa et al. 2003, Y. H. Cho et al. 2006, Balasubramanian et al. 2007, J. -I. Cho et al. 2009, Kim et al. 2013). Consequently, subcellular localization cannot be used to distinguish a Glc sensor HXK.

Type D HXKs

Type D HXKs are mitochondrial proteins; however, their mitochondrial anchor peptide is different from the peptide in Type B HXKs. This type of HXK has only been identified in the moss *P. patens.* PpHxk9, PpHxk10 and PpHxk11 are located mainly in the mitochondrial membrane, but it is also suggested that they are present in the chloroplast envelope. Given their distribution, it is suggested that Type D HXKs have the same metabolic function as Type B HXKs (Nilsson et al. 2011).

How HXKs Contribute to the Regulation of Plant Development

HXKs regulate the activity of photosynthesis through the repression of several photosynthetic genes or modulate the expression of enzymes that use carbon molecules to feed the biosynthetic pathways and produce energy. However, HXK functions affect not only the photosynthetic tissues but also the sink tissues. There is evidence that reveals the crucial role of HXK during different stages of plant development. The answer to how HXK affects all the stages of the plant life cycle probably lies in the cross-talk between Glc abundance signals in several hormone signaling pathways, such as: auxin (AUX), cytokinin (CK), abscisic acid (ABA), gibberellic acid, brassinosteroid (BR) and even the growth regulator melatonin.

An important stage of plant life that determines plant productivity is germination, and germination could be inhibited by non-metabolizable HXK substrates (Matheson and Myerst 1998). Non-catalytic and null OsHXK7 mutants are unable to germinate in oxygen-deficient conditions, which is opposite to what occurs when OsHXK7 is overexpressed, where seedling elongation is stimulated. These results suggest that a possible role for OsHXK7 is to drive glycolytic metabolic products to fermentation (Kim et al. 2016). In addition, expression of the *AtGASA6* gene, which encodes a membrane protein that acts as a positive regulator of germination, is repressed by 6% Glc through a mechanism involving AtHXK1, as repression is absent in *gin2-1* mutants (Zhong et al. 2015).

Glc abundance signaling by HXK has a profound impact on promoting or arresting seedling establishment. A high Glc concentration triggers an AtHXK1-mediated rise in the levels of ABA, which leads to the cessation of cell division and arrests seedling development (Arenas-Huertero et al. 2000). ABA is usually abundant during seed development, a metabolically active period that involves the storage of carbon reserves, not their mobilization. Thus, Glc arrest might be interpreted by the seedling as regression to a former stage, seed development (Rognoni et al. 2007). Plants that were overexpressing transcription factor EIN3 (Ethylene-insensitive3, a regulator in ethylene signaling) did not show arrest of development; moreover, EIN3 degradation was promoted by Glc in a post-translational process that depends on AtHXK1 sensor function (Yanagisawa et al. 2003). The exogenous addition of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) reverts the Glcbased seedling development arrest, in which AtHKL1 is essential to producing the antagonist effect (Karve and Moore 2009, Karve et al. 2012). In fact, it has been suggested that AtHKL1 and AtHXK1 act as antagonists, forming a critical node of the ethylene and Glc response (Karve et al. 2012). In contrast, at low Glc concentrations, seedling establishment is promoted due to the repression of the AtbZIP1 gene, which encodes a transcription factor that acts as a negative regulator of seedling growth.



This regulation is dependent on HXK's sensing function, but independent of ABA synthesis (Kang et al. 2010).

During vegetative development, HXKs actively participate in promoting plant growth. For example, at the transition checkpoint of heterotrophic to autotrophic conversion in A. thaliana, Glc alone promotes the activation of the root meristem through a TOR signaling pathway. This pathway depends on HXK's Glc phosphorylation to provide the intermediate metabolites for cell wall synthesis and to obtain the energy necessary for meristem proliferation (Xiong et al. 2013). Hexose monophosphates in the cytosol are substrates for the synthesis of nucleoside diphosphate sugars in cell wall biosynthesis, as demonstrated by the inhibition of polysaccharide biosynthesis when HXK competitive inhibitors are added (Galina and Da Silva 2000). In maize, $10 \,\mu M$ melatonin treatment improves plant growth and biomass accumulation, which correlates with an increase in the expression of ZmHXK4 and ZmHXK10, total HXK activity and glycolysis (Zhao et al. 2015).

In addition, A. thaliana gin2-1 mutants showed growth defects, such as diminished elongation of hypocotyls, roots and leaves, and a defect in auxin-induced root development, suggesting that AtHXK1 also positively interacts with the AUX signaling pathway (Moore et al. 2003). On the other hand, BR and 3% Glc induced hypocotyl elongation and lateral root growth (Mishra et al. 2009, Gupta et al. 2015, Zhang and He 2015). Experiments with mutants deficient in AtHXK1, BRI1 transmembrane receptor kinase, AUX receptor and AUX transporter (gin2-1, bri1-6, eir1 and aux1-7, respectively) showed a connection between HXK, BR and AUX signaling pathways. Glc abundance is perceived downstream by HXK1, signaling occurs through the BRI1 receptor and, at the end, the differential distribution of auxin transporters occurs by the AUX signaling pathway, which consequently regulates lateral root growth (Gupta et al. 2015).

During the autotrophic stage, high sugar synthesis occurs, and the translocation of sugars to non-photosynthetic tissues is vital to supporting plant growth. At the source tissues, it has been described that, besides suppressing photosynthetic gene expression (Jang et al. 1997, Moore et al. 2003, Y. H. Cho et al. 2006), HXK, together with ABA, also regulates photosynthetic activity through stomatal closure. Overexpression of AtHXK1 in the guard cells of both A. thaliana and citrus Troyer citrange increased the levels of RAB18 (ABA response gene) and ABI5 (ABA-induced transcription factor gene) and induced stomatal closure, consequently decreasing the transpiration rate. During high light intensity, photosynthetic activity increases, and HXK senses the excess of sugars, inducing stomatal closure. These results suggest a negative feedback mechanism to reduce transpiration and preserve cell water content during excessive photosynthetic activity (Kelly et al. 2012, Kelly et al. 2013, Lugassi et al. 2015). These results prove that HXK plays a key role in regulating photosynthetic activity by at least two different mechanisms.

Additionally, HXKs are involved in the development of sink tissues, as found in the plant reproductive phase. *Arabidopsis thaliana gin2-1* mutants show a reduced number of flowers and siliques (Moore et al. 2003). In rice, the *OsHXK10* gene is expressed in anthers, pollen and adult flowers; silencing the

OsHXK10 gene with RNA interference (RNAi) decreased the percentage of germinated pollen, and consequently increased the number of empty seeds. It was suggested that this phenomenon occurs due to the reduction of UDP-Glc available for cell wall biosynthesis or a low ATP content, which is derived from a reduction in the available hexose phosphate pool to continue glycolysis (Xu et al. 2008). However, the catalytic activity of OsHXK10 needs to be determined. Analysis of the primary structure of OsHXK10 revealed a high similarity to HXL proteins, which are non-catalytic HXKs (Karve et al. 2010). In addition, the association between Rf6-a pentatricopeptide repeat protein-with other HXKs and OsHXK6 at the mitochondria promotes the processing of the chimeric aberrant transcript atp6-orfH79, thus restoring male fertility. The mechanism of fertility restoration is not completely clear, but HXK is proposed to be a regulator of mitochondrial RNA metabolism, which is a new function for a plant HXK (Huang et al. 2015).

Another sink tissue affected by HXK is the fruit. In V. vinifera, a relationship between the decrease in HXK activity and the accumulation of free hexoses was observed as fruits matured (Wang et al. 2014). MdHXK1 (a mitochondrial HXK1 from apple) is not only able to phosphorylate hexoses; unexpectedly, it also phosphorylates MdbHLH, a key component of a transcriptional regulatory complex, to promote anthocyanin biosynthesis when Glc is abundant. Phosphorylation of MdbHLH by MdHXK1 stabilizes the protein and enhances transcriptional gene activation. The presence of domain 2 and the anchor mitochondrial sequence in MdHXK1 is suggested as a requirement for MdbHLH phosphorylation (Hu et al. 2016). CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated protein 9) and its capacity to regulate anthocyanin biosynthesis creates the possibility of using this knowledge for biotechnological purposes, as the anthocyanins are an important source of antioxidants and can provide coloration to fruits, making them more appealing to consumers. On the other hand, the protein phosphorylating capacity of HXK is a new function that connects Glc abundance with a change in gene expression, representing a different way in which HXK transduces the signal to other partners besides being part of a repressor complex.

During seed development in Helianthus annuus, the high activity of HXK coincided with the active phase of fatty acid synthesis and the OPPP (Troncoso-Ponce et al. 2009, Troncoso-Ponce et al. 2011). It is proposed that when HXK is highly active, large amounts of G6P are generated and can be directed to the OPPP to produce the NADPH needed for fatty acid synthesis (Troncoso-Ponce et al. 2011). A similar use of G6P is required during maize seed development because it serves as a source of NADPH for fatty acid biosynthesis in the plastid (Alonso et al. 2010). It was proposed that the high expression of ZmHXK3a and ZmHXK3b genes in two maize lines was related to the differences in starch accumulation that were observed in these lines (Xiao et al. 2016). Amino acid sequence analysis of ZmHXK3a and ZmHXK3b proposed that they are HXL (Karve et al. 2010, Zhang et al. 2014); however, to ascertain the physiological role of ZmHXK3a and ZmHXK3b in starch accumulation, their catalytic activity needs to be confirmed.



AtHXK1 perceives the accumulation of hexoses within the cell and stimulates senescence (Swartzberg et al. 2011). Overexpression of AtHXK1 accelerates senescence, while, in the *A. thaliana gin2-1* mutants, senescence is delayed (Dai et al. 1999, Moore et al. 2003). HXK's association with mitochondrial proteins may be able to address this question of how HXK senses Glc abundance and transduces a signal to begin senescence.

Conclusions and Perspectives

HXKs are multifaceted proteins with an essential role in a variety of processes that profoundly affect the whole plant cycle, such as promoting germination, preventing seedling establishment at high Glc concentrations, supporting vegetative growth and floriation, and restoring male fertility or transducing senescence signals. It is necessary to integrate information on the biochemical properties, location and sensor capacities of HXKs with other sugar-sensing pathways to improve plant productivity. An extensive characterization of known HXKs is necessary to find the mechanisms by which HXK transduces the Glc signal, mediates its protein interactions or phosphorylation, and translocates to the nucleus, and for understanding whether different sugar signal pathways interact with the HXK-dependent pathway. Additionally, the characterization of other HXK families is important for finding new protein partners to transduce Glc abundance, especially in important crops which specialize in accumulating sugar and biomass.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. José Antonio Pedroza-García and to MSc Elva Carolina Chávez-Hernández for critical reading of the manuscript.

Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología apoyo a Ciencia Básica [239605]; the Chemistry Faculty [PAIP50009125]; and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [a PhD fellowship (37024) to G.P.A.-A.].

Disclosures

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Aki, T. and Yanagisawa, S. (2009) Application of rice nuclear proteome analysis to the identification of evolutionarily conserved and glucoseresponsive nuclear proteins. J. Proteome Res. 8: 3912–3924.
- Alcántar-Aguirre, F.C., Chagolla, A., Tiessen, A., Délano, J.P. and González de la Vara, L.E. (2013) ATP produced by oxidative phosphorylation is channeled toward hexokinase bound to mitochondrial porin (VDAC) in beetroots (*Beta vulgaris*). *Planta* 237: 1571–1583.
- Alonso, A.P., Dale, V.L. and Shachar-Hill, Y. (2010) Understanding fatty acid synthesis in developing maize embryos using metabolic flux analysis. *Metab. Eng.* 12: 488–497.

- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J. and León, P. (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. Genes Dev. 14: 2085–9096.
- Balasubramanian, R., Karve, A., Kandasamy, M., Meagher, R.B. and Moore, B. (2007) A role for F-actin in hexokinase-mediated glucose signaling. *Plant Physiol.* 145: 1423–1434.
- Bruggeman, Q., Prunier, F., Mazubert, C., de Bont, L., Garmier, M., Lugan, R., et al. (2015) Involvement of *Arabidopsis* hexokinase1 in cell death mediated by myo-inositol accumulation. *Plant Cell*. 27: 1801–1814.
- Camacho-Pereira, J., Meyer, L.E., Machado, L.B., Oliveira, M.F. and Galina, A. (2009) Reactive oxygen species production by potato tuber mitochondria is modulated by mitochondrially bound hexokinase activity. *Plant Physiol.* 149: 1099–1110.
- Chahtane, H., Kim, W. and Lopez-Molina, L. (2016) Primary seed dormancy: a temporally multilayered riddle waiting to be unlocked. *J. Exp. Bot.* 68: 857–869.
- Cheng, W., Zhang, H., Zhou, X., Liu, H., Liu, Y., Li, J., et al. (2011) Subcellular localization of rice hexokinase (OsHXK) family members in the mesophyll protoplasts of tobacco. *Biol. Plant.* 55: 173–177.
- Cho, J.-I., Ryoo, N., Eom, J., Lee, D.-W., Kim, H., Jeong, S., et al. (2009) Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. *Plant Physiol.* 149: 745–759.
- Cho, J.-I., Ryoo, N., Ko, S., Lee, S.-K., Lee, J., Jung, K.-H., et al. (2006) Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 224: 598–611.
- Cho, Y.H., Yoo, S.D. and Sheen, J. (2006) Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell* 127: 579–589.
- Claeyssen, É. and Rivoal, J. (2007) Isozymes of plant hexokinase: occurrence, properties and functions. *Phytochemistry* 68: 709–731.
- Conde, C., Agasse, A., Glissant, D., Tavares, R., Hernâni, G. and Delrot, S. (2006) Pathways of glucose regulation of monosaccharide transport in grape cells. *Plant Physiol.* 141: 1563–1577.
- Cortès, S., Gromova, M., Evrard, A., Roby, C., Heyraud, A., Rolin, D.B., et al. (2003) In plants, 3-O-methylglucose is phosphorylated by hexokinase but not perceived as a sugar. *Plant Physiol.* 131: 824–837.
- Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., et al. (1999) Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* 11: 1253–1266.
- Damari-Weissler, H., Kandel-Kfir, M., Gidoni, D., Mett, A., Belausov, E. and Granot, D. (2006) Evidence for intracellular spatial separation of hexokinases and fructokinases in tomato plants. *Planta* 224: 1495–1502.
- da-Silva, W.S., Rezende, G.L. and Galina, A. (2001) Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: implications for hexose phosphorylation. *J. Exp. Bot.* 52: 1191–1201.
- Feng, J., Zhao, S., Chen, X., Wang, W., Dong, W., Chen, J., et al. (2015) Biochemical and structural study of *Arabidopsis* hexokinase 1. Acta Crystallogr. D 71: 367–375.
- Galina, A., Reis, M., Albuquerque, M.C., Puyou, A.G., Puyou, M.T. and de Meis, L. (1995) Different properties of the mitochondrial and cytosolic hexokinases in maize roots. *Biochem. J.* 309: 105–112.
- Galina, A. and Da Silva, W.S. (2000) Hexokinase activity alters sugarnucleotide formation in maize root homogenates. *Phytochemistry* 53: 29–37.
- Giegé, P., Heazlewood, J.L., Roessner-Tunali, U., Millar, A.H., Fernie, A.R., Leaver, C.J., et al. (2003) Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. *Plant Cell* 15: 2140–2151.
- Giese, J.-O., Herbers, K., Hoffmann, M., Klösgen, R.B. and Sonnewald, U. (2005) Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from *Nicotiana tabacum*. *FEBS Lett.* 579: 827–831.
- Graham, I., Denby, K. and Leaver, C. (1994) Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene-expression in Cucumber. *Plant Cell* 6: 761–772.



- Graham, J.W.A., Williams, T.C.R., Morgan, M., Fernie, A.R., Ratcliffe, R.G. and Sweetlove, L.J. (2007) Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell* 19: 3723–3738.
- Gupta, A., Singh, M. and Laxmi, A. (2015) Interaction between glucose and brassinosteroid during regulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana. Plant Physiol.* 168: 307–320.
- Hu, D.-G., Sun, C.-H., Zhang, Q.-Y., An, J.-P., You, C.-X. and Hao, Y.-J. (2016) Glucose sensor MdHXK1 phosphorylates and stabilizes MdbHLH3 to promote anthocyanin biosynthesis in apple. *PLoS Genet.* 12: e1006273.
- Huang, W., Yu, C., Hu, J., Wang, L., Dan, Z., Zhou, W., et al. (2015) Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 14984–14989.
- Jamsheer, K.M. and Laxmi, A. (2015) Expression of *Arabidopsis* FCS-Like Zinc finger genes is differentially regulated by sugars, cellular energy level, and abiotic stress. *Front. Plant Sci.* 6: 746.
- Jang, J.C., León, P., Zhou, L. and Sheen, J. (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell.* 9: 5–19.
- Jang, J.C. and Sheen, J. (1994) Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6: 1665–1679.
- Kandel-Kfir, M., Damari-Weissler, H., German, M.A., Gidoni, D., Mett, A., Belausov, E., et al. (2006) Two newly identified membrane-associated and plastidic tomato HXKs: characteristics, predicted structure and intracellular localization. *Planta* 224: 1341–1352.
- Kang, S.G., Price, J., Lin, P.C., Hong, J.C. and Jang, J.C. (2010) The Arabidopsis bZIP1 transcription factor is involved in sugar signaling, protein networking, and DNA binding. *Mol. Plant* 3: 361–373.
- Kano, A., Fukumoto, T., Ohtani, K., Yoshihara, A., Ohara, T., Tajima, S., et al. (2013) The rare sugar D-allose acts as a triggering molecule of rice defense via ROS generation. J. Exp. Bot. 64: 4939–4951.
- Karve, A. and Moore, B.D. (2009) Function of *Arabidopsis* hexokinase-like1 as a negative regulator of plant growth. J. Exp. Bot. 60: 4137–4149.
- Karve, A., Rauh, B.L., Xia, X., Kandasamy, M., Meagher, R.B., Sheen, J., et al. (2008) Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis*. *Planta* 228: 411–425.
- Karve, A., Xia, X. and Moore, B.D. (2012) Arabidopsis Hexokinase-Like1 and Hexokinase1 form a critical node in mediating plant glucose and ethylene responses. *Plant Physiol.* 158: 1965–1975.
- Karve, R., Lauria, M., Virnig, A., Xia, X., Rauh, B.L. and Moore, B.D. (2010) Evolutionary lineages and functional diversification of plant hexokinases. *Mol. Plant* 3: 334–346.
- Kelly, G., David-Schwartz, R., Sade, N., Moshelion, M., Levi, A., Alchanatis, V., et al. (2012) The pitfalls of transgenic selection and new roles of AtHXK1: a high level of AtHXK1 expression uncouples hexokinase1dependent sugar signaling from exogenous sugar. *Plant Physiol.* 159: 47–51.
- Kelly, G., Moshelion, M., David-Schwartz, R., Halperin, O., Wallach, R., Attia, Z., et al. (2013) Hexokinase mediates stomatal closure. *Plant J.* 75: 977– 988.
- Kim, H.B., Cho, J.I., Ryoo, N., Shin, D.H., Park, Y.I., Hwang, Y.S., et al. (2016) Role of rice cytosolic hexokinase OsHXK7 in sugar signaling and metabolism. J. Integr. Plant Biol. 58: 127–135.
- Kim, M., Lim, J.H., Ahn, C.S., Park, K., Kim, G.T., Kim, W.T., et al. (2006) Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 18: 2341–2355.
- Kim, Y.M., Heinzel, N., Giese, J.O., Koeber, J., Melzer, M., Rutten, T., et al. (2013) A dual role of tobacco hexokinase 1 in primary metabolism and sugar sensing. *Plant Cell Environ.* 36: 1311–1327.
- Lejay, L., Gansel, X., Cerezo, M., Tillard, P., Müller, C., Krapp, A., et al. (2003) Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell* 15: 2218–32.
- Lejay, L., Wirth, J., Pervent, M., Cross, J.M., Tillard, P. and Gojon, A. (2008) Oxidative pentose phosphate pathway-dependent sugar sensing as a

mechanism for regulation of root ion transporters by photosynthesis. *Plant Physiol.* 146: 2036–53.

- Lugassi, N., Kelly, G., Fidel, L., Yaniv, Y., Attia, Z., Levi, A., et al. (2015) Expression of *Arabidopsis* hexokinase in *Citrus* guard cells controls stomatal aperture and reduces transpiration. *Front. Plant Sci.* 6: 1114.
- Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y. and Liu, Y.-G. (2016) CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: developments and applications. *Mol. Plant* 9: 961–974.
- Matheson, N.K. and Myerst, D.K. (1998) Inhibition of germination by glucose analogues that are hexokinase substrates. *Phytochemistry* 48: 241–248.
- Miao, H., Cai, C., Wei, J., Huang, J., Chang, J., Qian, H., et al. (2016) Glucose enhances indolic glucosinolate biosynthesis without reducing primary sulfur assimilation. Sci. Rep. 6: 31854.
- Mishra, B.S., Singh, M., Aggrawal, P. and Laxmi, A. (2009) Glucose and auxin signaling interaction in controlling *Arabidopsis thaliana* seedlings root growth and development. *PLoS One* 4: e4502.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.-H., Liu, Y.-X., et al. (2003) Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300: 332–336.
- Nilsson, A., Olsson, T., Ulfstedt, M., Thelander, M. and Ronne, H. (2011) Two novel types of hexokinases in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol.* 11: 32.
- Olsson, T., Thelander, M. and Ronne, H. (2003) A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens. J. Biol. Chem.* 278: 44439–44447.
- Price, J., Laxmi, A. and Jang, J. (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2128–2150.
- Ramon, M., Rolland, F. and Sheen, J. (2008) Sugar sensing and signaling. *Arabidopsis Book* 6: e0117.
- Reda, M. (2015) Response of nitrate reductase activity and NIA genes expression in roots of *Arabidopsis* hxk1 mutant treated with selected carbon and nitrogen metabolites. *Plant Sci.* 230: 51–58.
- Rognoni, S., Teng, S., Arru, L., Smeekens, S.C.M. and Perata, P. (2007) Sugar effects on early seedling development in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul.* 52: 217–228.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J. (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 675–709.
- Rottmann, T., Zierer, W., Subert, C., Sauer, N. and Stadler, R. (2016) STP10 encodes a high-affinity monosaccharide transporter and is induced under low-glucose conditions in pollen tubes of Arabidopsis. J. Exp. Bot. 67: 2387–2399.
- Sarowar, S., Lee, J.Y., Ahn, E.R. and Pai, H.S. (2008) A role of hexokinases in plant resistance to oxidative stress and pathogen infection. *J. Plant Biol.* 51: 341–346.
- Sheen, J. (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2: 1027–1038.
- Sheen, J. (2014) Master regulators in plant glucose signaling networks. J. Plant Biol. 57: 67–79.
- Sun, J.Y., Chen, Y.M., Wang, Q.M., Chen, J. and Wang, X.C. (2006) Glucose inhibits the expression of triose phosphate/phosphate translocator gene in wheat via hexokinase-dependent mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38: 1102–1113.
- Swartzberg, D., Hanael, R. and Granot, D. (2011) Relationship between hexokinase and cytokinin in the regulation of leaf senescence and seed germination. *Plant Biol.* 13: 439–444.
- Troncoso-Ponce, M.A., Kruger, N.J., Ratcliffe, G., Garcés, R. and Martínez-Force, E. (2009) Characterization of glycolytic initial metabolites and enzyme activities in developing sunflower (Helianthus annuus L.) seeds. *Phytochemistry* 70: 1117–1122.
- Troncoso-Ponce, M.A., Rivoal, J., Dorion, S., Moisan, M.C., Garcés, R. and Martínez-Force, E. (2011) Cloning, biochemical characterization and expression of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) hexokinase associated


with seed storage compounds accumulation. J. Plant Physiol. 168: 299–308.

- Veramendi, J., Fernie, A.R., Leisse, A., Willmitzer, L. and Trethewey, R.N. (2002) Potato hexokinase 2 complements transgenic Arabidopsis plants deficient in hexokinase 1 but does not play a key role in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Mol. Biol.* 49: 491–501.
- Veramendi, J., Roessner, U., Renz, A., Willmitzer, L. and Trethewey, R.N. (1999) Antisense repression of hexokinase 1 leads to an overaccumulation of starch in leaves of transgenic potato plants but not to significant changes in tuber carbohydrate metabolism. *Plant Physiol*. 121: 123–134.
- Villadsen, D. and Smith, S.M. (2004) Identification of more than 200 glucose-responsive Arabidopsis genes none of which responds to 3-O-methylglucose or 6-deoxyglucose. Plant Mol. Biol. 55: 467–477.
- Wang, X.Q., Li, L.M., Yang, P.P. and Gong, C.L. (2014) The role of hexokinases from grape berries (*Vitis vinifera* L.) in regulating the expression of cell wall invertase and sucrose synthase genes. *Plant Cell Rep.* 33: 337–347.
- Xiao, W., Sheen, J. and Jang, J.C. (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Mol. Biol.* 44: 451–461.
- Xiao, Y., Thatcher, S., Wang, M., Wang, T., Beatty, M., Zastrow-Hayes, G., et al. (2016) Transcriptome analysis of near-isogenic lines provides molecular insights into starch biosynthesis in maize kernel. J. Int. Plant Biol. 58: 713–723.
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C. and Sheen, J. (2013) Glucose-TOR signaling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496: 181–186.

- Xu, F.Q., Li, X.R. and Ruan, Y.L. (2008) RNAi-mediated suppression of hexokinase gene OsHXK10 in rice leads to non-dehiscent anther and reduction of pollen germination. *Plant Sci.* 175: 674–684.
- Yanagisawa, S., Yoo, S.D. and Sheen, J. (2003) Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature* 425: 521–525.
- Yu, F., Li, L.M., Yang, P.P. and Wang, X.Q. (2013) Hexokinase from grape berries: Its prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation and biochemical property analyses. J. Plant Biochem. Biotechnol. 22: 324–334.
- Zhang, Y. and He, J. (2015) Sugar-induced plant growth is dependent on brassinosteroids. *Plant Signal. Behav.* 10: e1082700.
- Zhang, Z.W., Yuan, S., Xu, F., Yang, H., Zhang, N.H., Cheng, J., et al. (2010) The plastid hexokinase pHXK: a node of convergence for sugar and plastid signals in *Arabidopsis. FEBS Lett.* 584: 3573–3579.
- Zhang, Z., Zhang, J., Chen, Y., Li, R., Wang, H., Ding, L., et al. (2014) Isolation, structural analysis, and expression characteristics of the maize (*Zea mays* L.) hexokinase gene family. *Mol. Biol. Rep.* 41: 6157–6166.
- Zhao, H., Su, T., Huo, L., Wei, H., Jiang, Y., Xu, L., et al. (2015) Unveiling the mechanism of melatonin impacts on maize seedling growth: sugar metabolism as a case. J. Pineal Res. 59: 255–266.
- Zhong, C., Xu, H., Ye, S., Wang, S., Li, L., Zhang, S., et al. (2015) Gibberellic acid-stimulated Arabidopsis6 serves as an integrator of gibberellin, abscisic acid, and glucose signaling during seed germination in *Arabidopsis. Plant Physiol.* 169: 2288–2303.

Role of pyrimidine salvage pathway in the maintenance of organellar and nuclear genome integrity

José-Antonio Pedroza-García^{1,2}, Manuela Nájera-Martínez¹, Christelle Mazubert², Paulina Aguilera-Alvarado¹, Jeannine Drouin-Wahbi², Sobeida Sánchez-Nieto¹, José M. Gualberto³, Cécile Raynaud^{2,*} and Javier Plasencia^{1,*}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, 04510 CD, Mexico,

²Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IPS2), CNRS, INRA, Université Paris-Sud, Université Évry, Université Paris-Saclay, 91405, Orsay, Paris, France, and

³Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS-UPR2357, Université de Strasbourg, 67084, Strasbourg, France

Received 17 September 2018; accepted 8 October 2018.

*For correspondence (e-mail cecile.raynaud@ips2.universite-paris-saclay.fr or javierp@unam.mx).

SUMMARY

Nucleotide biosynthesis proceeds through a de novo pathway and a salvage route. In the salvage route, free bases and/or nucleosides are recycled to generate the corresponding nucleotides. Thymidine kinase (TK) is the first enzyme in the salvage pathway to recycle thymidine nucleosides as it phosphorylates thymidine to yield thymidine monophosphate. The Arabidopsis genome contains two TK genes -TK1a and TK1b- that show similar expression patterns during development. In this work, we studied the respective roles of the two genes during early development and in response to genotoxic agents targeting the organellar or the nuclear genome. We found that the pyrimidine salvage pathway is crucial for chloroplast development and genome replication, as well as for the maintenance of its integrity, and is thus likely to play a crucial role during the transition from heterotrophy to autotrophy after germination. Interestingly, defects in TK activity could be partially compensated by supplementation of the medium with sugar, and this effect resulted from both the availability of a carbon source and the activation of the nucleotide *de novo* synthesis pathway, providing evidence for a compensation mechanism between two routes of nucleotide biosynthesis that depend on nutrient availability. Finally, we found differential roles of the TK1a and TK1b genes during the plant response to genotoxic stress, suggesting that different pools of nucleotides exist within the cells and are required to respond to different types of DNA damage. Altogether, our results highlight the importance of the pyrimidine salvage pathway, both during plant development and in response to genotoxic stress.

Keywords: Arabidopsis, thymidine kinase, nucleotide metabolism, DNA damage.

INTRODUCTION

Nucleotides constitute the basic monomeric units required for the polymerization of DNA during replication and repair. In eukaryotic cells, the correct balance in deoxyribonucleotide (dNTP) pools contributes to the maintenance of nuclear and organellar genome integrity (Wang and Liu, 2006). Moreover, nucleotides are immediate precursors of some co-enzymes such as flavin adenine dinucleotide (FAD) and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), or serve as glucose donors in the synthesis of cellulose and in glycosylation reactions (Moffatt and Ashihara, 2002).

The dNTPs can derive from simple molecules – via the *de novo* pathway or from preformed precursors through the salvage pathway (Kafer *et al.*, 2004). Although *de novo*

nucleotide biosynthesis is energetically expensive, the salvage pathway uses the nucleoside backbones and free bases derived from the hydrolysis of nucleic acids to regenerate triphosphate nucleotides for nucleic acid synthesis. Functional analyses have shown that both routes are relevant for plant development, although their respective contributions vary depending on the plant developmental stage (Moffatt and Ashihara, 2002; Stasolla *et al.*, 2003; Kafer *et al.*, 2004). The energy-demanding *de novo* biosynthesis takes place in plastids and mitochondria, whereas the salvage pathway can follow both cytoplasmic and organellar routes (Zrenner *et al.*, 2006).

Ribonucleotide reduction by ribonucleotide reductase (RNR) is the rate-limiting step in the *de novo* pathway.

RNR reduces the ribose moiety at the C2' position in all four NDPs. Deoxyuridine monophoshpate is then methylated by thymidylate synthase (TS) in a methylenetetrahydrofolatedependent reaction to produce dTMP, which is finally phosphorylated twice (Kafer *et al.*, 2004). The importance of the *de novo* pathway has been shown by molecular genetic analysis of RNR subunit mutants. Mutations on RNR genes impair plant development, chloroplast biogenesis and organelle DNA replication, and cause hypersensitivity to UV radiation (Wang and Liu, 2006; Garton *et al.*, 2007).

The salvage pathway is also required for growth and development in plants. Each nucleotide is recycled via a specific pathway involving several enzymes that first allow conjugation of the free base to the ribose moiety and then phosphorylation of the nucleoside to form mono-, di- and triphosphate nucleotides (Zrenner et al., 2006). The role of the adenosine salvage pathway has been determined through the silencing of the first enzyme of the pathway: adenosine kinase (ADK) in Arabidopsis. Reduction in protein levels beyond 90% impacts root and hypocotyl elongation (Moffatt et al., 2002). In addition, inactivation of the UPP gene, a member of the uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) family in Arabidopsis, leads to severe dwarfism and a pale-green to albino phenotype, which was associated with compromised chloroplast biogenesis. This phenotype is consistent with the subcellular location of the enzyme in plastids (Mainquet et al., 2009).

Salvage of the thymidine nucleoside is carried out by thymidine kinase (TK1), to yield dTMP. This nucleotide is quickly phosphorylated to dTDP by thymidylate kinase (TMPK), and further to its triphosphate form by nucleoside diphosphate kinase (NDK). Thymidine kinase is highly conserved among eukaryotes with the exception of yeast and other fungi, which lack the salvage pathway. Plant cells also contain TK1 genes: the *Arabidopsis thaliana* genome encompasses two TK1 genes (*TK1a* and *TK1b*, also named *TK1* and *TK2*), and TK1a and b share 58% identity at the protein level. Whereas mutants for each *TK1* gene show almost normal growth, the double mutant (*tk1a tk1b*) seed-lings die at the cotyledon stage (Clausen *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015), indicating that TK1 activity is essential for plant development.

One pending question is how carbohydrate metabolism relates to the control of nucleotide biosynthesis and to the balance between the *de novo* and the salvage pathways. Indeed, the two routes drastically differ in their energy requirements. In plants, the TOR1 kinase controls the expression of S-phase genes according to glucose availability by activating the E2Fa transcription factor (Polyn *et al.*, 2015). Transcriptome studies demonstrated that glucose and/or sucrose induces nucleotide synthesis gene expression of both the salvage and the *de novo* routes through a TOR–E2F pathway in root meristems (Xiong *et al.*, 2013). Thus, it is possible that increased glucose

availability could compensate for the loss of nucleotide recycling, as was described in the case of the *upp* mutant, the phenotype of which was partly rescued when sucrose was added to the growth medium (Mainguet *et al.*, 2009).

Another pending guestion is whether TK1a and b play different roles in plant cells, notably in response to stress conditions. Only TK1a is upregulated by genotoxic agents such as mitomycin C and UV-C radiation, and its overexpression confers tolerance to those treatments, suggesting that TK1a contributes to provide dTTP for DNA repair (Pedroza-García et al., 2015). Indeed, TK1a has been shown to be a core target of the DNA damage response (DDR). Upon DNA damage, DNA lesions are sensed by ATM (ataxia telangiectasia mutated) and ATR (ATM and Rad3 related), two phosphatydilinositol kinase-related proteins that are involved in the perception of double-strand breaks and single-stranded DNA, respectively. Once activated, they phosphorylate and activate the SOG1 transcription factor (Yoshiyama et al., 2013, 2017; Sjogren et al., 2015), the functional homologue of human p53, which in turn stimulates the expression of DNA repair genes and checkpoint factors that arrest cell cycle progression (Hu et al., 2016). Transcriptomic studies in response to genotoxic stress using Arabidopsis mutants of DDR transducers suggest that the ATM- but not the ATR-dependent pathway regulates AtTK1a in response to gamma radiation (Culligan et al., 2006). By contrast, the contribution of TK1b to the DDR has been little explored, and further studies are thus required to really determine how AtTK1a and AtTK1b genes are regulated during the DDR, and how they contribute to plant tolerance to DNA damage.

Another difference between these two proteins is that TK1b has an organellar transit peptide comprising 36 amino acids at the N terminal. The TK1b-YFP fusion protein localizes in the mitochondria of Arabidopsis protoplasts (Xu *et al.*, 2015). The presence of TK in a genomebearing organelle suggests that one TK1b function could be to supply dTTP for organellar DNA replication and repair. A prominent role in the maintenance of organelle genome integrity would account for the albino or palegreen phenotype of various mutants affected in the nucleotide biosynthesis pathways (Garton *et al.*, 2007; Mainguet *et al.*, 2009; Yoo *et al.*, 2009; Niu *et al.*, 2017). In this work, we explored the differential roles of the two TK genes in safeguarding nuclear and organellar DNA integrity, as well as in their regulation during the DDR.

RESULTS

In the absence of sucrose, TK1b is necessary for early plant development

Single homozygous *tk1b* mutants have been described previously and have been shown to be indistinguishable from the wild type at the adult stage (Clausen *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015). At early developmental stages they display smaller yellow cotyledons under normal growth conditions (Xu *et al.*, 2015), however, suggesting that chloroplast biogenesis during photomorphogenesis is affected in the absence of TK1b. To further explore the origin of these defects, we used the same single homozygous *tk1b* mutant (SALK_074256; referred to as *tk2-1* in Xu *et al.*, 2015). The T-DNA insertion in this line is located within the unique exon and causes an 80% reduction of *TK1b* transcript levels compared with wild-type Col-0; however, the total TK enzymatic activity (Data S1) was reduced only by 40–50% compared with wild-type plants, as a result of the presence of the *TK1a* gene (Figure S1a–d).

We first asked whether the de novo pathway might compensate for the loss of TK1b activity. To address this guestion, we grew tk1b mutant seedlings without sucrose to minimize the contribution of the energy-requiring *de novo* synthesis, or in the presence of sucrose to allow its activation. In the absence of sucrose, the growth of the mutant seedlings was affected (Figure 1a). As previously reported, the *tk1b* mutant showed a delay in greening (Figure 1b). In addition, we observed that the development of the first true leaves was delayed (Figure 1c), and root length was 30% shorter than in the wild type (Figure 1d). This reduction in root elongation was likely to arise from the inhibition of cell proliferation, as the meristem length was reduced in the mutant (Figure S2). The growth phenotype was rescued by overexpression of the wild-type *TK1b* gene in the *tk1b* genetic background (Figures 1a, d and S2), confirming that the defects were linked to the reduction of TK1b activity. Moreover, the addition of sucrose to the growth medium fully rescued the tk1b root growth defects (Figure 1e, f).

Glucose signalling induces the expression of genes from the nucleotide *de novo* synthesis, compensating for the deficiency of the salvage pathway

As sucrose rescued the *tk1b* phenotype, we asked whether this was linked to its role as a carbon source or to the activation of nucleotide biosynthesis, likely through the TOR (target of rapamycin) signalling pathway (Xiong et al., 2013). We tested two additional sugars: glucose and fructose. Glucose rescued the root length and the meristem size of tk1b seedlings (Figures 2a, b and S2). In the presence of fructose, tk1b roots were longer than on plain GB5 media, but did not reach the same length as wild-type plants (Figure 2a, b), thus suggesting that fructose might be acting solely as a carbon source whereas sucrose/glucose might also induce the *de novo* pathway. To test this hypothesis, we grew seedlings on GB5 media containing 2-deoxyglucose (2-DG), a non-metabolizable glucose analogue that blocks glycolysis (Xiong et al., 2013). Under these conditions, the tk1b plants stopped development and showed albino cotyledons (Figure 2c). This severe phenotype was partially rescued by adding glucose to the medium, suggesting that nutrient deprivation caused by the presence of 2-DG was responsible for the phenotype; however, the roots remained short both in the wild type and in the mutant plants (Figure S3).

The development arrest and bleaching of *tk1b* mutants exposed to 2-DG could indicate that this mutant relies on de novo nucleotide biosynthesis to compensate for the reduced activity of the salvage pathway, leading to defects in chloroplast biogenesis when activation of this route is compromised. To determine whether the effects of glucose and 2-DG on the *tk1b* growth phenotype correlated with changes in the expression of genes involved in nucleotide biosynthesis, we monitored the expression of five genes (Data S1) that are representative of the two thymidine biosynthesis pathways in root tips of wild-type and mutant plants (Figure 2d). For the *de novo* pathway we chose two RNR subunits (RNR1 and TSO2) and TS, and for the salvage pathway we analysed the expression of TK1a and TK1b. In both wild-type and tk1b mutants, the expression of genes involved in thymidine recycling was largely insensitive to glucose or 2DG. By contrast, TSO2 and RNR1 were upregulated in the presence of glucose, whereas 2-DG caused a repression of TSO2 and TS. In the presence of both glucose and 2-DG, the expression of all genes tested was identical to or even higher than the basal expression level on control medium in both lines, consistent with the observed phenotypes. These antagonistic effects of glucose and 2-DG on the expression of *de novo* dNTP biosynthesis genes are consistent with a regulation of nucleotide biosynthesis genes according to sugar availability. In this context, sugar metabolism and signalling would be critical for *tk1b* mutants to develop because they rely mainly on de novo biosynthesis for dTTP production.

Previous studies have reported that inactivation of both TK genes in Arabidopsis results in a seedling-lethal phenotype (Clausen et al., 2012; Xu et al., 2015). To further study the functional redundancy between the two enzymes and to determine whether the addition of sucrose could rescue the double mutants, we crossed the tk1b mutant with the two tk1a mutants characterized previously [SALK_094632, here referred to as tk1a-1, as in Clausen et al. (2012), and SALK_097767, referred to as tk1a-2 and tk1-1 in Clausen et al. (2012) and Xu et al. (2015), respectively]. As previously described, sesquimutant seedlings (tk1a/+tk1b) showed chlorotic cotyledons (Figure S4a). They also showed a more severe reduction of root growth than *tk1b* single mutants, and rescue of this phenotype was dependent on the addition of sucrose in the growth medium (Figure S4a, b). At later developmental stages, sesquimutant plants were smaller than the wild type or single mutants and showed leaf variegation (Figure S4c).

Consistent with previous reports, the double mutants (*tk1a tk1b*) were albino (Clausen *et al.*, 2012; Xu *et al.*,



Figure 1. tk1b mutant seedlings show delayed development that can be rescued by the addition of sucrose to the growth medium. (a-d) Wild-type (Col-0), tk1b mutants and tk1b-complemented mutants were germinated in GB5 agar medium without any carbon source. Plant phenotype (a), and the proportion of green plants (b), plants with true leaves (c), as well as average root length (d) were determined after 9 days. (e, f) Wild-type (Col-0) and tk1b mutant seedlings were grown in GB5 agar medium supplemented with 1 or 2% sucrose, and root length was measured after 9 days. Values in (b) and (c) were obtained from at least five independent experiments (n = 100 seedlings per genotype); different letters denote statistically significant differences (Student's *t*-test: P < 0.05). Values in panel (d) (n = 36 seedlings per genotype) and (f) (n = 27 seedlings per genotype) are averages \pm SEs. In panels (d) and (f), different letters indicate significantly different values, as analysed by ANOVA followed by Tukey's test for comparison of means (P < 0.01). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com].

2015). In addition, they had even smaller roots than the sesquimutants (Figure S4a). Interestingly, this root growth phenotype was partially restored by sucrose (Figure S4ab). It was reported that these double mutant plants stop developing at the cotyledon stage (Clausen et al., 2012; Xu et al., 2015), and we therefore tested whether the addition of sugar in the growth medium during the first 2 weeks would favour the development of plants beyond that stage. Although the root growth of the double mutant was partially restored by sucrose, they grew slowly and when the seedlings were transferred to potting mix, they managed to develop leaves with pale-green variegation varying towards fully albino leaves (Figure S4c). None of the plants grown in the absence of sugar survived: they stopped developing and died roughly 6 weeks after transfer to soil (Figure S4d). In contrast, when plants were grown on medium supplemented with sucrose, they displayed improved growth and leaf greening, and approximately 50% of these plants reached the flowering stage (Figure S4e).

Taken together, our results suggest that the loss of TK activity affects several aspects of cellular physiology, but is particularly detrimental to the development of chloroplasts and thus for the ability of plants to grow photo-autotrophically.

TK1b has dual organellar localization and *TK1* deficiency affects organelle DNA replication

To explore the role of TK activity in the maintenance of the organellar genome, we compared organelle genome copy numbers in tk mutants and wild-type plants. As shown in Figure 3(a), the relative abundance of organellar genomes compared with the nuclear genome remained unchanged in single tk1a-2 or tk1b mutants. By contrast, chloroplast genome copy number was 65% and 84% lower in sesquimutants and double mutant plants, respectively. We observed a 20% reduction in the relative abundance of the mitochondrial genome only in the double mutant. To check that these changes in the relative abundance of organellar genomes was not due to changes in the nuclear DNA content, we monitored endoreduplication levels in the cotyledons of all lines. As shown in Figure S5, endoreduplication was unchanged in tk1a-2 and tk1b mutants. By contrast, endoreduplication was decreased in tk1a-2/+tk1b sesquimutants, and even more so in tk1a-2 tk1b double mutants. This drop in endoreduplication is consistent with the albino phenotype of the plants, as endoreduplication in cotyledons is triggered by light during photomorphogenesis, and the same reduction of endoreduplication was observed in the Figure 2. Glucose restores tk1b mutant root growth. (a, b) Col-0 and tk1b mutant seedlings were grown in GB5 agar medium without any carbon source and supplemented with equimolar concentrations of glucose and fructose (30 mm). Root length was determined after 9 days. Values in panel (b) are averages \pm SEs (n = 37) and different letters indicate significantly different values, as analysed by ANOVA followed by Tukey's test for comparison of means (P < 0.01). (c) Col-0 and tk1b mutant seedlings were grown in GB5 agar medium without any carbon source for 3 days and then were transferred to the indicated medium for 3 days. (d) qRT-PCR analysis of the expression of various genes involved in the de novo (TSO2, RNR1 and TS) and salvage (TK1a and TK1b) nucleotide biosynthesis pathways, in wild-type (Col-0) and tk1b mutant root tips; seedlings were grown in GB5 agar medium without any carbon source for 3 days, and then they were transferred to corresponding treatments for 12 h before sample collection. Data shown here are representative of at least two biological replicates. Different letters indicate significantly different values, as analysed by ANOVA followed by Tukey's test for comparison of means (P < 0.01). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Roles of Arabidopsis thymidine kinase genes 5



apg3 (albino and pale green 3) mutant, which has an albino phenotype as a result of disruption to ribosome release factor 1 (Motohashi *et al.*, 2007; Figure S5). Importantly, as the nuclear genome copy number per cell was reduced in sesqui and double mutants, the observed changes in the nuclear DNA content of mutants cannot account for the decrease in relative organelle genome abundance. The observed reduction in chloroplast genome accumulation could merely be a consequence of the albino phenotype of the mutants. To rule out this possibility, we used the *apg3* mutant as a control. The relative abundance of the chloroplast genome remained unchanged in these plants (Figure 3a), confirming that the defects observed in *tk* mutants are not the consequence of abnormal chloroplast differentiation.

These results suggest that TK1b might be located in both organelles and not exclusively in the mitochondria, as was reported previously (Xu *et al.*, 2015). To clarify this,

we employed both transient and stable transformation strategies of TK1b-GFP fusions. Arabidopsis plants expressing the TK1b-GFP fusions were examined by confocal microscopy; GFP signal was observed in both organelles in hypocotyl cells (Figure S6a). The TK1b-GFP fusion was transiently expressed in Arabidopsis protoplast (Figure S6b-c) and Nicotiana benthamiana (tobacco) leaves (Figure 3b-c) via agroinfiltration. Expression of TK1b-GFP in tobacco leaves showed that GFP signal and chlorophyll autofluorescence displayed similar distribution patterns, supporting the hypothesis that TK1b was targeted to chloroplast (Figure 3b). To confirm the putative chloroplast location, we used a construct encompassing a translational fusion between the chloroplast-targeting peptide and mCherry (mt-rk CD3-999; Nelson et al., 2007). As shown in Figure S6(b) the GFP signal co-localized with mCherry inside chloroplasts, forming punctuated structures. We also analysed the co-localization of TK1b-GFP with a





Figure 3. TK1 deficiency affects organelle DNA abundance, and TK1b is located in both mitochondria and chloroplast. (a) qPCR analysis of mitochondria and chloroplast genome copy number relative to nuclear copy number in 9-day-old seedlings of Col-0, tk1b, tk1a-2, tk1a-2 tk1b double mutant and (tk1a-2/+tk1b) sesquimutant. Total genomic DNA was extracted from 9-day-old plantlets of the indicated genotypes. Relative DNA copy number was measured by qPCR using the nuclear UBQ10 gene as a reference; The ccmFn2 (encoding a protein involved in cytochrome c biogenesis) and cox1 (encoding the main subunit of the respiratory complex IV) genes were used to monitor mitochondrial genome abundance, and the ycf2 (encoding a protein of unknown function) and rbcL (encoding the large subunit of RuBisCO) genes were used for the chloroplastic genome. Values are given as relative abundances compared with the wild type (Col-0). Bars are averages \pm standard deviations, obtained from three technical replicates, and are representative of two biological replicates. Asterisks indicate significantly relevant differences compared with the wild type (ANOVA followed by Tukey's test, P < 0.001). (b) Transient expression of TK1b-GFP in tobacco leaves, the GFP signal is located in the chloroplast. (c) Transient co-expression of TK1b-GFP with mito-mCherry in Agroinfiltrated tobacco leaves. Arrows point to chloroplasts that are visible in the red channel as a result of chlorophyl fluorescence. [Colour figure can be viewed at wileyonline librarv.coml.

mitochondrial marker using both protoplast transformation and agroinfiltration of tobacco leaves. In Arabidopsis protoplasts, we observed poor co-localization signals of TK1B-GFP fusion and the mitochondrial marker (Figure S6c). By contrast, we observed clear co-localization between TK1b-GFP and the mito-mcherry marker in agroinfiltrated tobacco leaves (Figure 3c). Moreover, we detected GFPlabelled chloroplasts inside the same cell (Figures 3c and S6c). Further evidence of chloroplastic localization comes from data in the Plant Proteome Database (http://ppdb.tc.c ornell.edu ; Sun *et al.*, 2009) that identifies several TK1bderived peptides in samples prepared from chloroplast stroma. These results indicate that the TK1b protein has the potential to be targeted both to plastids and to mitochondria.

Our data support the hypothesis that this enzyme has dual organellar localization and contributes towards DNA synthesis in both compartments, similarly to other proteins involved in organellar DNA replication (Blomme *et al.*, 2017; Carrie *et al.*, 2009; Cupp and Nielsen, 2014; Moriyama and Sato, 2014).

TK1b is required for organellar genome integrity

Although greening was affected in *tk1b* mutants, we were not able to detect any modification of the organellar DNA content in these lines. One possibility could be that TK1b is also required for chloroplastic DNA repair, and that defects in this process could result in delayed greening. To demonstrate the role of TK1b in the maintenance of organellar genome integrity, we treated Arabidopsis seedlings with ciprofloxacin, a DNA gyrase inhibitor, that induces the formation of double-strand breaks (DSBs) in organellar DNA (Cappadocia *et al.*, 2010; Evans-Roberts *et al.*, 2016). Homozygous *tk1b* seedlings were hypersensitive to ciprofloxacin compared with wild-type Col-0 seedlings (Figure 4a, b). Root growth was reduced by 20% in Figure 4. The tk1b mutant shows increased sensitivity to the organelle DNA replication inhibitor ciprofloxacin. (a) Col-0 and tk1b mutant seedlings were germinated on GB5 agar medium supplemented with 0.25 and 0.5 µM ciprofloxacin, an organelle DNA gyrase inhibitor that causes doublestranded breaks, (b) and (c). Root length was measured in 9-day-old seedlings and values in panel (c) are averages \pm SEs (n = 23) and different letters indicate significant mean differences, as analysed by ANOVA followed by Tukey's comparison test (P < 0.01). (d) Shows relative root growth of wild type and tk1b mutant seedlings grown on ciprofloxacin-containing medium compared with non-treated seedlings. [Colour figure can be viewed at wile vonlinelibrary.coml.

Roles of Arabidopsis thymidine kinase genes 7



wild-type plants and by 45% in tk1b mutants grown in the presence of 0.25 µm ciprofloxacin (Figure 4c-d). To determine whether this role in the maintenance of organelle genome integrity was specific to TK1b, we tested the sensitivity of the two *tk1a* mutants to ciprofloxacin. These plants did not show hypersensitivity to the antibiotic at the lowest concentration (0.25 um), although we observed a modest but statistically significant difference in the root length between wild-type and mutant plants at 0.5 µM (Figure S7). TK1b overexpression did not significantly increase root growth in presence of the antibiotic (Figure S8a, b), but slightly improved the development of first true leaves (Figure S8c). We also tested the sensitivity to CIP in other TK mutant alleles and as Figure S9(a) shows, only the tk1b plants displayed chlorosis at CIP concentrations that have a mild effect on Col-0 and tk1a mutants. Furthermore, complementation of the tk1b mutant with the full-length cDNA rescued the hypersensitivity to CIP (Figure S9b). These results indicate that TK1b has a relevant role in the maintenance of the organelle genome integrity.

To further explore this hypothesis, we determined organelle genome abundance in plants grown on medium with ciprofloxacin and novobiocin, another inhibitor of organelle DNA avrases that does not directly induce DSB. but interferes with organelle DNA replication (Cappadocia et al., 2010). We evaluated two mitochondria-specific genes (ccfm2 and cox1) and two chloroplast-specific genes (rbcL and vcf2). Ciprofloxacin led to a drastic reduction in mitochondria and chloroplast genome copy number on both lines, but the tk1b mutant was more sensitive than the wild type, particularly for the plastid genome (Figure 5). Novobiocin did not affect mitochondria genome copy number, either in Col-0 or in tk1b mutants. Interestingly, it only caused a reduction of plastid genome copy number in tk1b mutants but not in Col-0 (Figure 5), indicating that TK1b plays a role in the maintenance of chloroplast genome integrity when its replication is challenged. Transmission electron microscopy ultrastructural analysis (Data S1) showed that in the absence of the antibiotic, chloroplasts from the cotyledons of Col-0 and tk1b mutants are crescent shaped with well-formed thylakoid membranes (Figure S10, sections 1 and 3). Ciprofloxacin at low concentration (0.25 µm) caused disturbed chloroplast morphology and disorganization of the thylakoids. Such observations were similar for both wild-type and *tk1b* mutant seedlings treated with ciprofloxacin (Figure S10, sections 2



Figure 5. Organellar genome integrity is compromised in *tk1b* mutants upon ciprofloxacin exposure. gPCR analysis of mitochondria and chloroplast genome copy number relative to nuclear copy number in 9-day-old seedlings of Col-0 and tk1b mutant germinated in the presence of 0.25 µM ciprofloxacin (CIP) or 15 µM novobiocin (NOV). Nuclear (UBQ10), mitochondrial (ccmFn2 and cox1) and chloroplastic (rbcL and ycf2) genes were used as markers for each compartment. Values are normalized to UBQ10 abundance in the wild type (Col-0) in the absence of treatment. Bars are averages \pm standard deviations obtained from three technical replicates and are representative of two biological replicates. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.c oml.

and 4). Thus, the ciprofloxacin concentration (0.25 μ M) that we employed had differential effects in the wild type and in the *tk1b* mutants in terms of root growth and organelle genome copy number, but not in terms of ultrastructure.

As described above, the addition of sugars in the medium rescued the root growth phenotype in *tk1b* mutants. To test the effects of sugars in response to genotoxic agents, we challenged Col-0 and *tk1b* mutant seedlings with ciprofloxacin, in the absence/presence of sucrose, glucose or fructose. Without any added sugar, the tk1b mutant showed hypersensitivity to ciprofloxacin (46% growth reduction at 0.25 µm) versus 22% reduction in Col-0 (Figure 6a). In the presence of sucrose, glucose or fructose, however, both genotypes displayed enhanced tolerance to the antibiotic, and only at the highest ciprofloxacin concentration was a significant decrease in root length observed (Figure 6b-d), providing further evidence for the complementary roles of the *de novo* and salvage pathways in the safeguard of organelle genome integrity. We performed a similar experiment with the seedlings grown in novobiocin and found than none of the three sugars tested rescued the rootgrowth inhibition caused by this gyrase inhibitor (Figure S11). Supplementation with sugars caused the plants to remain green, however, and the percentage of plants showing true leaves increased in both Col-0 and tk1b mutant seedlings (Figure S12). We next asked whether TK1b could be involved in the protection of the chloroplast genome under stress conditions. Data mining of public transcriptome data using GENEVESTIGATOR revealed that TK1b, but not TK1a, is highly induced when plants are shifted to high light conditions (Figure S13a). To confirm the role of TK1b in the maintenance of the chloroplast genome integrity upon photo-oxidative stress, we tested the sensitivity of tk1b mutants to norflurazon. This herbicide inhibits carotenoid biosynthesis, thereby resulting in severe photoinhibitory

stress and bleaching. As shown in Figure S13(b), *tk1b* mutants and *tk1a/+b* sesquimutants showed more severe bleaching and growth reduction than wild-type plants, providing further evidence for a role of TK1b in the maintenance of organellar genome in response to stress conditions such as excess light.

Finally, we asked whether the response to organellar DNA damage involved canonical DDR signalling proteins. To this end, *atm*, *atr* and *sog1* mutants were germinated on ciprofloxacin. As shown in Figure 7, the development of first leaves was more severely affected in DDR mutants than in the wild type, and at higher doses of ciprofloxacin DDR mutants and particularly *sog1* showed more severe bleaching than the wild type, indicating that proteins identified for their role in the maintenance of nuclear genome integrity could also be involved in the response to organellar DNA damage.

Differential roles of TK1a and TK1b in the DNA damage response

In human fibroblasts, the mitochondria thymidine kinase TK2 has been shown to play an essential role in nuclear DNA repair (Lee *et al.*, 2014). We therefore explored whether plant TK1b is required in the response to other types of genotoxic stress. To this end, we treated wild-type and *tk* mutant lines with two additional genotoxins: hydroxyurea (HU), an RNR inhibitor that causes stalled DNA replication forks and abundant single-stranded DNA, and ZeocinTM that induces DSBs. The *TK1b* mutation led to a drastic decrease in root length compared with wild-type seedlings (Figure 8a, b) exposed to HU. This severe hypersensitivity is likely to result from the fact that *tk1b* mutants rely on *de novo* biosynthesis for dNTP production. By contrast, *tk1b* mutants did not display hypersensitivity to ZeocinTM (Figure 8c, d). Reciprocally, *TK1b* overexpression did





Figure 6. Sugars rescue *tk*1b mutant hypersensitivity to ciprofloxacin. Col-0 and *tk*1b mutant seedlings were grown in GB5 agar medium containing 0.25 or 0.5 μ M ciprofloxacin without any carbon source (a) or supplemented with equimolar concentrations (30 mM) of sucrose (b), glucose (c) or fructose (d). Root length was measured in 9-day-old seedlings and values are averages \pm SEs (n = 20), and different letters in each panel indicate significantly different values, as analysed by ANOVA followed by Tukey's test for comparison of means (P < 0.01).

not confer tolerance to ZeocinTM (Figure S8d–f), in contrast with what was previously reported for *TK1a* overexpression (Pedroza-García *et al.*, 2015). Interestingly, *tk1a* mutants were hypersensitive to both HU and ZeocinTM (Figure S14). These results suggest that TK1a and TK1b are required for the appropriate response to different kinds of genotoxic stress, and are likely to display a differential transcriptional regulation during DDR.

We next asked whether *TK1a* and *TK1b* were differentially regulated during the DDR as suggested by transcriptome analyses. To this end, we used transgenic plants expressing the *uidA* gene under the control of the *TK1a* or *TK1b* promoter. We followed the expression changes following DDR activation in the root tip. We treated 5-day-old seedlings with ciprofloxacin, HU or ZeocinTM for 12 h before GUS staining (Data S1). Figure 9 shows that only seedlings containing the *AtTK1a* promoter displayed a strong induction of GUS activity in the root meristem after exposure to HU or ZeocinTM, which is consistent with the hypersensitivity shown by *tk1a* mutants to these genotoxins (Figure S14). The *TK1a* promoter did not respond to ciprofloxacin. GUS activity driven by the AtTK1b promoter remained unchanged with all treatments tested (Figure 9), suggesting that TK1b is not regulated transcriptionally during the first 12 h of exposure, albeit that it is required for a proper response to ciprofloxacin and HU (Figures 4 and 8).

DISCUSSION

A correct balance in dNTP pools is crucial for the maintenance of nuclear and organellar genome integrity, but the contribution of TK to this process has only been partially explored (Clausen *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2015). Here we have further investigated the role of Arabidopsis TKs in safeguarding organellar and nuclear genome integrity, and their importance for chloroplast development at the transition between heterotrophy and autotrophy.

The thymidine salvage pathway is required for proper plant growth at the transition from heterotrophy to autotrophy

Studies of the plant pyrimidine salvage pathway revealed that this route plays an important role during early





Figure 7. Sensitivity of DDR mutants to organelle DNA damage. (a) Plantlets were germinated on MS supplemented with ciprofloxacin (0.25 μ M). After 10 days, some plantlets had developed normal first leaves (Class I), whereas others had slightly bleached and smaller leaves (Class II), and others had severely bleached and deformed leaves that in some cases had almost not developed (Class III). The percentage of plants in each phenotypic class was assessed. (b) On higher doses of ciprofloxacin (0.5 μ M), all plantlets failed to develop true leaves, and the cotyledons agreed bleached. Chlorophyll quantification revealed that *atm*, *atr* and to a greater extent *sog1* showed more severe bleaching than wild-type plants. Data are averages \pm SDs, and different letters indicate statistically relevant differences (ANOVA followed by Tukey's test, *P* < 0.05). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com].

development (Zrenner *et al.*, 2006; Mainguet *et al.*, 2009); salvage synthesis is highly active in the first steps of germination in white spruce, and its contribution declines as germination progresses and the *de novo* synthesis pathway takes over (Stasolla *et al.*, 2002, 2003). In addition to the previously described delayed greening of *tk1b* mutants, and the albino phenotype of the *tk1a tk1b* double mutants and sesquimutants (Clausen et al., 2012; Xu et al., 2015), we observed that a loss of TK1b results in reduced root growth through a decrease of meristem size. Sustained cell division in the root meristem during early seedling development depends on the establishment of photosynthetic activity in the shoot (Xiong et al., 2013). As chloroplast development is impaired in tk1b and tk1a/+tk1b sesquimutants, we hypothesized that the observed defects in root growth were an indirect consequence of impaired chloroplast function in cotyledons. An indirect role of TK1b on root cell proliferation would also be consistent with the fact that TK1b is not highly expressed in root meristems under standard conditions (Figure 9). Consistently, the addition of sucrose to the growth medium could rescue the root growth deficiency. In plants, the TOR1 kinase controls the expression of S-phase genes according to glucose availability by activating the E2Fa transcription factor (Polyn et al., 2015). This pathway allows the reactivation of cell divisions in the root meristem (Xiong et al., 2013) via the upregulation of hundreds of genes, including those involved in the *de novo* nucleotide biosynthesis. AtTK1a, AtRNR1 and AtTSO2 contain a potential E2F-binding element in their promoter region, and microarray analysis of Arabidopsis seedlings ectopically expressing the E2F and DPa transcription factors support the idea that they are potential E2F targets (Vandepoele et al., 2005). Sucrose supplementation could thus rescue the root growth defects of *tk1b* mutants either by providing a carbon source for ATP production or by triggering the TOR-E2F pathway, and thereby de novo nucleotide biosynthesis. To explore the respective contributions of the metabolic and signalling roles of sugars, we compared the effect of glucose and fructose on the root growth of the mutant. Glucose, but not fructose, fully rescued root length in *tk1b* mutants, and expression of *de novo* synthesis genes was induced by glucose in the *tk1b* mutant: the reduction in root growth is thus likely to result from both lower carbon assimilation associated with the delayed greening phenotype of the mutant and low dTTP availability. This hypothesis is corroborated by the fact that 2-DG, a non-metabolizable glucose analogue that blocks glycolysis (Xiong et al., 2013), could antagonize the effect of sucrose on the root phenotype of *tk1b* mutants: it is thus likely that the root growth defects of the tk1b mutant mainly result from defects in the chloroplastic function of cotyledons.

The observation that the *tk1b* mutant, like the *upp* mutant (Mainguet *et al.*, 2009), can be rescued by sugar supplementation suggests that pyrimidine recycling is key for growth at early stages during the transition from heterotrophy to autotrophy, before the onset of photosynthesis allows the activation of the more energy-demanding *de novo* biosynthesis pathway (Stasolla *et al.*, 2003; Zrenner *et al.*, 2006). These complementary roles of the two routes for nucleotide biosynthesis have been described

Figure 8. Differential requirement for TK1b in response to HU or ZeocinTM. (a–d) Wild-type (Col-0) and *tk1b* mutants were germinated in GB5 agar medium and 4-day-old seedlings were transferred to GB5 agar medium without or supplemented with genotoxins: 2 mm HU or ZeocinTM (5 and 10 μ M). Root length was measured 9 days after transfer. Panels (a)–(c) show averages \pm SEs (n = 23), and different letters indicate significantly different values, as analysed by ANOVA followed by Tukey's test for comparison of means (P < 0.01). Panels (b)–(d) represent relative root growth compared with control medium.



previously: in *Solanum tuberosum*, the inhibition of *de novo* pyrimidine synthesis can be compensated for by an increased activity of the salvage pathway (Geigenberger *et al.*, 2005). Taken together, our results suggest that nucleotide recycling is particularly crucial for chloroplast development and activity.

Differential roles of TK1a and TK1b in the maintenance of the nuclear and organellar genomes

Arabidopsis mutants deficient for RNR subunits -rnr1 and tso2- display variegated leaves like tk1a/+tk1b sesquimutants (Wang and Liu, 2006), and rnr1 tissues have fewer copies of chloroplast genome compared with that of wildtype plants (Garton et al., 2007). Likewise, rice mutants lacking the deoxycytidine monophosphate deaminase have an imbalanced dNTP pool with reduced dTTP levels. This mutation triggers decreased cell proliferation, defective chloroplast development and impaired DNA repair capacity (Niu et al., 2017). These results suggest that organelle DNA replication is highly sensitive to reduced dNTPs levels. In agreement with this hypothesis, sesqui- and double tk1 mutants showed a decrease in chloroplast genome copy number, and only double mutant lines displayed a reduction in the number of mitochondria genome copies, indicating that TK1 activity is required for organelle DNA replication, particularly in chloroplasts. Consistent with these results, we found that TK1b has a dual location in chloroplasts and mitochondria, and not exclusively in mitochondria, as reported previously (Xu et al., 2015). Strikingly, the distribution of TK1b between chloroplasts and mitochondria varied between experiments: in our experience, it was exclusively located in plastids in some assays (Figure 3b), whereas in others it accumulated both in plastids and mitochondria (Figures 3c and S6b-c). The dual targeting of proteins to organelles is relatively frequent (Sharma et al., 2018). It has been shown to rely either on the production of two different polypeptides from a single gene through alternative transcription or translation initiation sites, or on the presence of an ambiguous targeting sequence (Sharma et al., 2018). Both mechanisms could explain the discrepancy between our data and that of Xu et al. (2015). Indeed, if TK1b dual targeting depends on alternative transcription or translation initiation sites, the regulatory sequences governing the choice of initiation site could be incomplete in GFP-fusion constructs encompassing only the coding sequence. Likewise, an ambiguous targeting sequence could allow accumulation in one organelle or the other, depending on the expression level of the protein, of the cell type or in response to stress caused by the transformation procedure. Future work will help to determine how dual targeting of TK1b is controlled, and whether its localization varies depending on cell types, developmental stages or stress conditions, but our data obtained through various approaches and independently in two laboratories very strongly argue for the dual localization of this protein.



Figure 9. Differential response of Arabidopsis *TK1* genes to genotoxic stress. Transgenic Col-0 seeds containing the p*TK1a*::GUS or p*TK1b*::GUS transcriptional fusions were germinated on GB5 media, and 5-day-old seedlings were treated with 2 μ m ciprofloxacin, 2 mm hydroxyurea or 10 μ m ZeocinTM for 12 h before staining for GUS activity. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com].

Further evidence of TK1b targeting to chloroplasts comes from data in the Plant Proteome Database (http://ppdb.tc.c ornell.edu ; Sun et al., 2009) that identifies several TK1bderived peptides in samples prepared from chloroplast stroma. Moreover, *tk1b* plants displayed hypersensitivity to antibiotics that inhibit organellar DNA replication and a decrease in the organellar DNA copies number in the presence of these drugs, compared with wild-type seedlings. Importantly, the chloroplastic genome was much more severely affected than the mitochondrial genome, providing further evidence for a role of TK1b inside chloroplasts. Together, these data support that TK1b has dual organellar localization and contributes to DNA synthesis in both mitochondria and chloroplasts, similarly to other proteins involved in organellar DNA replication and repair (Cappadocia et al., 2010; Rowan et al., 2010; Parent et al., 2011). Interestingly, the addition of sugar to the growth medium largely alleviated the effect of ciprofloxacin on plant growth, irrespective of genotype, possibly via the glucose-dependent activation of many S-phase genes, including those involved in the *de novo* nucleotide biosynthesis and DNA repair (Xiong et al., 2013).

TK1b appears to play the most prominent role in the maintenance of organellar genomes, as *tk1a* mutants do

not show reduced growth or organellar genome replication in response to organellar DNA damage. The loss of TK1a aggravates the phenotype of tk1b mutants in normal growth conditions, however, suggesting an active exchange of thymidine nucleotides from different cellular compartments. Indeed, substrates for the pyrimidine salvage pathway can shuttle between the cytoplasm and organelles (Witz et al., 2012; Girke et al., 2014). In addition, both tk1 single mutants displayed hypersensitivity to HU, an RNR inhibitor, consistent with the notion that exchanges can exist between cytoplasmic and organellar nucleotide pools. A similar observation has been reported in mammalian cells, where the cytoplasmic TK1 can rescue defects caused by the loss of the mitochondrial TK2 protein (Pontarin et al., 2003; Ferraro et al., 2006). Finally, sugar supplementation to the growth medium rescued the sensitivity of tk1b mutants to ciprofloxacin. This indicates that *de novo* nucleotide biosynthesis stimulated by sugar can compensate for the deficiency in nucleotide recycling, providing further evidence for the complementary roles of the two nucleotide biosynthesis pathwavs.

Overall, TK1b appears to be more specifically involved in the maintenance of organellar genomes, although some redundancy can exist with TK1a. By contrast, only tk1a mutants displayed hypersensitivity to Zeocin[™] that induces DSBs, suggesting that TK1a may be more specifically required for nuclear genome repair. In agreement with this hypothesis, TK1a and TK1b differ by their regulation in response to DNA damage. Indeed, TK1a belongs to the set of core genes induced by multiple DNA-damaging agents (Yi et al., 2014). For instance, the expression of TK1a is induced by almost 50-fold after gamma radiation in wildtype Arabidopsis seedlings, and this induction drops to twofold in atm mutants (Culligan et al., 2006; Ricaud et al., 2007). A similar decrease in the induction of TK1a expression to ionizing radiation was observed in the sog1-1 mutant (Yoshiyama et al., 2009), consistent with the recent finding that TK1a and RNR subunit genes are direct targets of SOG1 (Ogita et al., 2018). In addition, lines deficient for the replicative DNA Pol ε showed the constitutive activation of DDR genes, including TK1a. In this context, TK1a activation was dependent upon SOG1 but not upon ATM (Pedroza-Garcia et al., 2016; Pedroza-García et al., 2017), indicating that both the ATR and the ATM branches of the DDR can trigger TK1a expression. In agreement with the previous findings, we found that TK1a expression was strongly induced when plants were exposed to genotoxic stress (Pedroza-García et al., 2015), whereas expression of TK1b did not seem to vary much in response to genotoxic stress.

In animals, there is extensive evidence for a connection between the DDR and organelle function. Indeed, ATM controls mitochondrial response to nuclear DNA damage (Valentin-Vega et al., 2012; Shimura et al., 2017), and contributes to the maintenance of mtDNA copy numbers in fibroblasts under normal conditions (Eaton et al., 2007). Likewise, ATR is recruited at the mitochondrial periphery to control glucose starvation-induced autophagy in yeast (Yi et al., 2017), and was shown to suppress cytochrome c release from mitochondria, thereby inhibiting apoptosis (Hilton et al., 2015). Reciprocally, the sensing of mtDNA damage can trigger the relocalization of repair-related proteins in mitochondria, including p53 (Wong et al., 2009; Boesch et al., 2011), the SOG1 functional homologue. Here, we found that sog1 is hypersensitive to genotoxins targeting organelle DNA, suggesting that retrograde signalling pathways are activated by chloroplast DNA damage to trigger SOG1 activity. Indeed, it has been shown previously that ROS production in organelles activates ATM and the DDR pathway (Yi et al., 2014), and that chloroplast dysfunction induces the expression of SOG1 target genes (Hudik et al., 2014), some of which could be involved in the protection or repair of organelle genomes. A plethora of retrograde signalling routes have been described (de Souza et al., 2017), however, and further studies will be needed to determine how they are connected to the DDR. Recently,

Roles of Arabidopsis thymidine kinase genes 13

in Arabidopsis, it was shown that the N-terminal of ATM interacts with RUG3, a mitochondria protein, and that this interaction occurs within organelles, possibly to control the organelle DDR (Su *et al.*, 2017). In line with these findings, we observed that DDR components are required for plant tolerance to organelle DNA damage. Interestingly, SOG1 appears to play a more prominent role than ATM or ATR, suggesting that both kinases could function redundantly to trigger its activity in response to organelle DNA damage. Further experiments will be required to fully elucidate the connections between plant DDR and retrograde signalling, and how they contribute to safe-guard organelle genome integrity.

CONCLUSIONS

We have shown that TK1b has roles in organelle DNA replication and repair. Recently, it was reported that *tk1b* mutant plants are hypersensitive to chilling stress (Wang *et al.*, 2016), and a similar phenotype has been described for rice mutant plants of RNR small subunit (Chen *et al.*, 2015), highlighting the importance of a proper dNTP pool balance for the survival of plant cells during development and in response to environmental stresses. Although, many roles are conserved between plants and other eukaryotes, the regulation of plant TK1 might differ from what has been described in mammals. Indeed, the post-translational regulation of plant TK1 has been demonstrated to be different from that of other eukaryotes (Mutahir *et al.*, 2013).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant materials and growth conditions

Seeds were surface sterilized by treatment with a solution containing 5% sodium hypochlorite for 20 min, and then washed and imbibed in sterile water for 2-4 days at 4°C to obtain homogeneous germination. Seeds were sown on commercially available GB5 agar medium (Gamborg's B5 Basal Medium; Sigma-Aldrich, https://www.sigmaaldrich.com) supplemented with the appropriate sugar (30 mm) if needed and solidified with 1% agar (Phyto-Agar HP696; Kalys, fr.kalys.com) and grown under long-day conditions (16 h light, 8 h night, 21°C) in a growth chamber. After 2 weeks, the plants were transferred to soil in a glasshouse under short-day conditions (8 h light 20°C, 16 h night at 18°C) for 2 weeks before being transferred to long-day conditions. For the selection of transgenic lines, seeds of the T_1 generation were sown on sand and watered with a solution of glufosinate (7.5 mg L⁻¹) or in GB5 supplemented with hygromycin 30 μg ml $^{-1},$ according to the resistance. Independent lines were self-fertilized, and homozygous lines of the T_3 generation were used for all subsequent experiments.

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia (Col-0) was used as the wild-type plant throughout this study. The T-DNA insertion mutant lines for both AtTK genes [SALK_094632 (tk1a-1) and SALK_097767 (tk1a-2); SALK 074256 (tk1b) and GK457H01 (tk1b-3)] were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (https://abrc.osu.edu). Crosses were performed between the heterozygous tk1a mutant and the homozygous tk1b mutant to

obtain sesquimutant and double mutants, and the primers used for the genotyping of these lines are listed in Table S1.

Genotoxic treatments

To evaluate the sensitivity to genotoxic agents [hydroxyurea (HU), ZeocinTM (Zeo) or ciprofloxacin (CIP)], Arabidopsis seeds were sown in GB5 agar medium supplemented with genotoxin at the indicated concentrations. After 9 days, the plantlets were analysed for root length, true leaf formation and green plant percentage.

Cloning and plasmid constructs

Arabidopsis thaliana TKs clones were obtained from cDNA of 7day-old seedlings. Primers were designed on specific 5' and 3' untranslated regions (UTRs) using PRIMER3PLUS. Primer sequences are listed in Table S1. PCR was performed using high-fidelity polymerase Advantage HD (Clontech, now TaKaRa, https:// www.takarabio.com) and the products were purified from agarose gel and cloned in pGEM®-T Easy vector (Promega, https:// www.promega.com) with T_4 DNA ligase according to the manufacturer's instructions. Ligation products were used to transform competent Escherichia coli DH5a. Recombinant vectors were sequenced to verify the identity of the clones and the direction of the insert. Gateway[®] technology was used for subcloning the open reading frames (ORFs) of the TK genes omitting the stop codon into pDONR™221 vector (ThermoFisher Scientific, https:// www.thermofisher.com) by BP clonase reaction (Invitrogen, now ThermoFisher Scientific) in order to generate the entry clones. After that, these entry clones were digested with the restriction enzyme Mlul (FD0564; ThermoFisher Scientific) and the fragments of approximately 2500 bp were subcloned into pEarleyGate 103 (GFP fusion) and pGWB14 (3HA fusion) binary vectors (Earley et al., 2006) by LR clonase reaction (Invitrogen). These constructs were used for complementation of mutants and to determine subcellular location. In parallel, another set of constructs was generated for particle bombardment. The TK1b coding sequence was cloned into the pUCAP-GFP vector, upstream and in frame with eGFP. The pTK1a/b::GUS constructs were described in Pedroza-García et al. (2015).

Confocal microscopy

To evaluate the subcellular location from AtTK1b-GFP, fusion was performed by the transformation of protoplasts according to the method described by Yoo *et al.* (2007). Leaves of 3- to 4-week-old plants from *A. thaliana* (Col-0) were used for protoplast isolation. The transfection was performed with the PEG-calcium method. Protoplasts were co-transfected with the AtTK1b-GFP fusion and the organelle markers fused to mCherry for mitochondria or plastid (stocks # CD3-991 and CD3-999, respectively, from ABRC, https://www.arabidopsis.org). After 18 h, transfected protoplasts were visualized. Fluorescence was monitored with the confocal Microscope Olympus FV1000, using 488/505–545 nm (excitation/emission) for mCherry.

To confirm the subcellular localization of AtTK1b we performed agroinfiltration. Agrobacterium strain GV3.101 transformed with TK1b-GFP or mt-rk CD3-991 (Nelson *et al.*, 2007) was grown overnight in LB medium containing the appropriate antibiotics. Cells were washed twice in infiltration medium [10 mM MgCl₂, 10 mM 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), pH 7.0, 150 μ M acetosyringone], and the OD_{600 nm} was adjusted to 0.1. Leaf discs were observed under a confocal microscope (LSM880; Zeiss, https://www.zeiss.com) 2 days after

infiltration. We also used particle bombardment to further confirm our results. Young leaves of *N. benthamiana* were transfected by bombardment with a Biolistic PDS-1000/He[™] System (Bio-Rad, http://www.bio-rad.com). After 24 h, the fluorescence of GFP and chlorophyll was observed at 505–540 nm and beyond 650 nm, respectively, after excitation at 488 nm on a Zeiss LSM700 confocal microscope.

Determination of organellar DNA copy number

Total genomic DNA was extracted from 10-day-old plantlets as previously described in Doyle and Doyle (1987). Organelle copy number was quantified by quantitative polymerase chain reaction (qPCR), using the nuclear gene *UBC21* as a reference. Each qPCR reaction was performed using 1 ng of genomic DNA. For each organellar genome, we used two pairs of primers targeting two different genes (*cox1* and *ccmFn2* for the mitochondrial genome, and *rbcL* and *ycf2* for the chloroplastic genome). The primer sequences are listed in Table S1.

Flow cytometry

For flow cytometry analysis, tissues were chopped with a razor blade in 1 ml of Gif nuclei-isolation buffer [45 mM MgCl₂, 30 mM sodium citrate, 60 mM 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) , 1% (w/v) polyvinylpyrrolidone 10 000, pH 7.2] containing 0.1% (w/v) Triton X-100, supplemented with sodium metabisulphite (5 mM) and RNAse (5 U ml⁻¹). Propidium iodide was added to the filtered supernatants to a final concentration of 50 μ g ml⁻¹. Endoreduplication levels of 5000–10 000 stained nuclei were determined using a Cyflow SL3 flow cytometer (Sysmex Partec, https://www.sysmex-partec.com) with a 532-nm solid state laser (30 mW) excitation and an emission collected after a 590-nm long-pass filter.

Statistical analysis

All statistical analysis was performed using ${\tt statistix}^{\circledast}$ (https:// www.statistix.com).

Accession numbers

The sequence data of the genes analysed in this work were obtained from the Arabidopsis Genome Initiative Database under the following accession numbers: AT3G07800 (*TK1a*), AT5G23070 (*TK1b*), AT2G21790 (*RNR1*), AT3G27060 (*TSO2*), AT3G23580 (*RNR2A*), AT5G40942 (*RNR2B*), AT2G16370 (*TS1*), AT1G27450 (*APT1*), AT5G25760 (*UBC21*), ATMG01360 (*COX1*), ATMG00960 (*CCMFN2*), ATCG00490 (*RBCL*) and ATCG00860 (*YCF2*).

ACKNOWLEDGEMENTS

Imaging was performed in part at the IPS2 Plant Imaging Facility and at USAII and IFC, UNAM. We are grateful to Etienne Delannoy (IPS2) for advice and help with organelle genome copy number estimation. We acknowledge L. de la Rosa-Ortega for genotyping the *tk1a* mutants. Research in J.P.'s laboratory is supported by a grant (IN213517) from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) and by a grant (PAIP 5000-9121) from Facultad de Química, UNAM. Research in S.S.-N.'s laboratory is supported by a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant (239605).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

J.A-P.-G., C.R. and J.P. conceived and designed the study. J.A.P.-G., M.N.M, C.M., P.A.A., J.D.-W. J.M.G. and C.R. performed the experiments, J.A.P.-G., S.S.-N., C.R. and J.P. analysed the data. J.A.P.-G., S.S.-N., C.R. and J.P. wrote and revised the manuscript.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Figure S1. Molecular characterization of SALK_074256 T-DNA insertion mutant for the *TK1b* gene.

Figure S2. Root meristem size is reduced in the absence of sugar in tk1b mutants.

Figure S3. Glucose did not fully rescue the inhibitory effect of 2-DG on root growth.

Figure S4. Sucrose restores the root growth phenotype in sesquimutant and double mutant plants.

Figure S5. Endoreduplication reduced TK-deficient mutants.

Figure S6 TK1b accumulates both in plastids and mitochondria in planta.

Figure S7. TK1a mutants display slight hypersensitivity to ciprofloxacin.

Figure S8. Sensitivity to ciprofloxacin and Zeocin[™] of *TK1b* overexpresser lines.

Figure S9. Requirement for efficient TK1b for efficient chloroplast DNA repair.

Figure S10. Ciprofloxacin similarly affects chloroplast ultrastructure in wild-type and *tk1b* mutants.

Figure S11. Sugars do not rescue the hypersensitivity to novobiocin (NOV) determined by root growth.

Figure S12. Sugars rescue hypersensitivity to novobiocin (NOV) analysed in aerial tissue.

Figure S13. TK1b is required for the maintenance of the chloroplast genome in response to photooxidative stress.

Figure S14. tk1a mutants are hypersensitive to hydroxyurea and ZeocinTM.

 Table S1. Primer sequences employed in this study.

Data S1. RNA extraction and quantitative PCR; transmission electron microscopy; histochemical staining of GUS activity and TK enzymatic activity.

REFERENCES

- Blomme, J., Van Aken, O., Van Leene, J. (2017) The mitochondrial DNAassociated protein SWIB5 influences mtDNA architecture and homologous recombination. *Plant Cell*, **29**, 1137–1156. https://doi.org/10.1105/ tpc.16.00899.
- Boesch, P., Weber-Lotfi, F., Ibrahim, N., Tarasenko, V., Cosset, A., Paulus, F. and Dietrich, A. (2011) DNA repair in organelles: pathways, organization, regulation, relevance in disease and aging. *Biochim. Biophys. Acta*, 1813, 186–200. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.002.
- Cappadocia, L., Maréchal, A., Parent, J.-S., Lepage, E., Sygusch, J. and Brisson, N. (2010) Crystal structures of DNA-Whirly complexes and their role in Arabidopsis organelle genome repair. *Plant Cell*, 22, 1849–1867. https://doi.org/10.1105/tpc.109.071399.
- Carrie, C., Kühn, K., Murcha, M.W., Duncan, O., Small, I.D., O'Toole, N. and Whelan, J. (2009) Approaches to defining dual-targeted proteins in Arabidopsis. *Plant J.* 57, 1128–1139. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008. 03745.x.

- Chen, X., Zhu, L., Xin, L., Du, K., Ran, X., Cui, X., Xiang, Q., Zhang, H., Peizo, X. and Wu, X. (2015) Rice *stripe1-2* and *stripe1-3* mutants encoding the small subunit of ribonucleotide reductase are temperature sensitive and are required for chlorophyll biosynthesis. *PLoS One*, **10**, e0130172. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130172.
- Clausen, A.R., Girandon, L., Ali, A., Knecht, W., Rozpedowska, E., Sandrini, M.P.B., Andreasson, E., Munch-Petersen, B. and Piškur, J. (2012) Two thymidine kinases and one multisubstrate deoxyribonucleoside kinase salvage DNA precursors in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* 279, 3889–3897. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08747.x.
- Culligan, K.M., Robertson, C.E., Foreman, J., Doerner, P. and Britt, A.B. (2006) ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J.* 48, 947–961. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02931.x.
- Cupp, J.D. and Nielsen, B.L. (2014) Minireview: DNA replication in plant mitochondria. *Mitochondrion*, **19 Pt B**, 231–237. https://doi.org/10.1016/j. mito.2014.03.008.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **19**, 11–15 Key: citeu-like:678648.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K. and Pikaard, C.S. (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.* 45, 616–629. https://doi.org/10.1111/j. 1365-313X.2005.02617.x.
- Eaton, J.S., Lin, Z.P., Sartorelli, A.C., Bonawitz, N.D. and Shadel, G.S. (2007) Ataxia-telangiectasia mutated kinase regulates ribonucleotide reductase and mitochondrial homeostasis. J. Clin. Invest. 117, 2723–2734. https://d oi.org/10.1172/JCI31604.
- Evans-Roberts, K.M., Mitchenall, L.A., Wall, M.K., Leroux, J., Mylne, J. and Maxwell, A. (2016) DNA gyrase is the target for the quinolone drug ciprofloxacin in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 29, 3136–3144. https://doi. org/10.1074/jbc.M115.689554.
- Ferraro, P., Nicolosi, L., Bernardi, P., Reichard, P. and Bianchi, V. (2006) Mitochondrial deoxynucleotide pool sizes in mouse liver and evidence for a transport mechanism for thymidine monophosphate. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 18586–18591. https://doi.org/10.1073/pnas. 0609020103.
- Garton, S., Knight, H., Warren, G.J., Knight, M.R. and Thorlby, G.J. (2007) crinkled leaves 8 - A mutation in the large subunit of ribonucleotide reductase - leads to defects in leaf development and chloroplast division in Arabidopsis thaliana. Plant J. 50, 118–127. https://doi.org/10.1111/j. 1365-313X.2007.03035.
- Geigenberger, P., Regierer, B., Nunes-Nesi, A., Leisse, A., Urbanczyk-Wochniak, E., Springer, F., van Dongen, J.T., Kossmann, J. and Fernie, A.R. (2005) Inhibition of *de novo* pyrimidine synthesis in growing potato tubers leads to a compensatory stimulation of the pyrimidine salvage pathway and a subsequent increase in biosynthetic performance. *Plant Cell*, **17**, 2077–2088. https://doi.org/10.1105/tpc.105.033548.
- Girke, C., Daumann, M., Niopek-Witz, S. and Möhlmann, T. (2014) Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Front. Plant Sci.* 5, 443. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00443.
- Hilton, B.A., Li, Z., Musich, P.R., Wang, H., Cartwright, B.M., Serrano, M., Zhou, X.Z., Lu, K.P. and Zou, Y. (2015) ATR plays a direct antiapoptotic role at mitochondria, which is regulated by prolyl isomerase Pin1. *Mol. Cell*, 60, 35–46. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.008.
- Hu, Z., Cools, T. and De Veylder, L. (2016) Mechanisms used by plants to cope with DNA damage. Ann. Rev. Plant Biol. 67, 439–462. https://doi. org/10.1146/annurev-arplant-043015-111902.
- Hudik, E., Yoshioka, Y., Domenichini, S. et al. (2014) Chloroplast dysfunction causes multiple defects in cell cycle progression in the Arabidopsis crumpled leaf mutant. Plant Physiol. 166, 152–167. https://doi.org/10. 1104/pp.114.242628.
- Kafer, C., Zhou, L., Santoso, D., Guirgis, A., Weers, B., Park, S. and Thornburg, R. (2004) Regulation of pyrimidine metabolism in plants. *Front Biosci.* 9, 1611–1625.
- Lee, M.-H., Wang, L. and Chang, Z.-F. (2014) The contribution of mitochondrial thymidylate synthesis in preventing the nuclear genome stress. *Nucleic Acids Res.* 42, 4972–4984. https://doi.org/10.1093/nar/ gku152.
- Mainguet, S.E., Gakière, B., Majira, A., Pelletier, S., Bringel, F., Guérard, F., Caboche, M., Berthome, R. and Renou, J.P. (2009) Uracil salvage is

© 2018 The Authors

The Plant Journal © 2018 John Wiley & Sons Ltd, The Plant Journal, (2018), doi: 10.1111/tpj.14128

necessary for early Arabidopsis development. *Plant J.* **60**, 280–290. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03963.

- Moffatt, B.A. and Ashihara, H. (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*, 1, e0018. https://doi.org/10. 1199/tab.0018.
- Moffatt, B.A., Stevens, Y.Y., Allen, M.S., Snider, J.D., Pereira, L.A., Todorova, M.I., Summers, P.S., Weretilnyk, E.A., Martin-McCaffrey, L. and Wagner, C. (2002) Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiol.* 128, 812–821. https://doi.org/10.1104/pp.010880.
- Moriyama, T. and Sato, N. (2014) Enzymes involved in organellar DNA replication in photosynthetic eukaryotes. *Front. Plant Sci.* 5, 480. https://doi. org/10.3389/fpls.2014.00480.
- Motohashi, R., Yamazaki, T., Myouga, F. et al. (2007) Chloroplast ribosome release factor 1 (AtcpRF1) is essential for chloroplast development. *Plant Mol. Biol.* 64, 481–497. https://doi.org/10.1007/s11103-007-9166-7.
- Mutahir, Z., Clausen, A.R., Andersson, K.-M., Wisen, S.M., Munch-Petersen, B. and Piškur, J. (2013) Thymidine kinase 1 regulatory fine-tuning through tetramer formation. *FEBS J.* 280, 1531–1541. https://doi.org/10. 1111/febs.12154.
- Nelson, B.K., Cai, X. and Nebenführ, A. (2007) A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J.* 51, 1126–1136. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03212.
- Niu, M., Wang, Y., Wang, C. et al. (2017) ALR encoding dCMP deaminase is critical for DNA damage repair, cell cycle progression and plant development in rice. J. Exp. Bot. 68, 5773–5786. https://doi.org/10.1093/jxb/erx380.
- Ogita, N., Okushima, Y., Tokizawa, M. et al. (2018) Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in Arabidopsis. Plant J. 94, 439–453, https://doi.org/10.1111/toi.13866.
- Parent, J.-S., Lepage, E. and Brisson, N. (2011) Divergent roles for the two Poll-like organelle DNA polymerases of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 156, 254–262. https://doi.org/10.1104/pp.111.173849.
- Pedroza-Garcia, J.A., Domenichini, S., Mazubert, C. et al. (2016) Role of the polymerase ε sub-unit DPB2 in DNA replication, cell cycle regulation and DNA damage response in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 44, 7251–7266. https://doi.org/10.1093/nar/gkw449.
- Pedroza-García, J.A., Nájera-Martínez, M., de la Paz Sanchez, M. and Plasencia, J. (2015) Arabidopsis thaliana thymidine kinase 1a is ubiquitously expressed during development and contributes to confer tolerance to genotoxic stress. *Plant Mol. Biol.* 87, 303–315. https://doi.org/10. 1007/s11103-014-0277-7.
- Pedroza-García, J.-A., Mazubert, C., Del Olmo, I., Bourge, M., Domenichini, S., Bounon, R. and Raynaud, C. (2017) Function of the plant DNA polymerase epsilon in replicative stress sensing, a genetic analysis. *Plant Physiol.* 173, 1735–1749. https://doi.org/10.1104/pp.17.00031.
- Polyn, S., Willems, A. and De Veylder, L. (2015) Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 23, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.09.012.
- Pontarin, G., Gallinaro, L., Ferraro, P., Reichard, P. and Bianchi, V. (2003) Origins of mitochondrial thymidine triphosphate: dynamic relations to cytosolic pools. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 12159–12164. https://doi. org/10.1073/pnas.1635259100.
- Ricaud, L., Proux, C., Renou, J.P., Pichon, O., Fochesato, S., Ortet, P. and Montané, M.H. (2007) ATM-mediated transcriptional and developmental responses to γ-rays in Arabidopsis. *PLoS One*, 2, e430. https://doi.org/10. 1371/journal.pone.0000430.
- Rowan, B.A., Oldenburg, D.J. and Bendich, A.J. (2010) RecA maintains the integrity of chloroplast DNA molecules in *Arabidopsis. J. Exp. Bot.* 10, 2575–2588.
- Sharma, M., Bennewitz, B. and Klögsen, R.F. (2018) Dual or not dual? Comparative analysis of fluorescence microscopy-based approaches to study organelle targeting specificity of nuclear-encoded plant proteins. *Front. Plant Sci.* 9, 1350. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01350.
- Shimura, T., Sasatani, M., Kawai, H., Kamiya, K., Kobayashi, J., Komatsu, K. and Kunugita, N. (2017) ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts. *Cell Cycle*, 16, 2345–2354. https://doi.org/10.1080/15384101. 2017.1387697.
- Sjogren, C.A., Bolaris, S.C. and Larsen, P.B. (2015) Aluminum-dependent terminal differentiation of the Arabidopsis root tip is mediated through

an ATR-, ALT2-, and SOG1-regulated transcriptional response. *Plant Cell*, **27**, 2501–2515. https://doi.org/10.1105/tpc.15.00172.

- de Souza, A., Wang, J.-Z. and Dehesh, K. (2017) Retrograde signals: integrators of interorganellar communication and orchestrators of plant development. Annu. Rev. Plant Biol. 68, 85–108. https://doi.org/10.1146/annure v-arplant-042916-041007.
- Stasolla, C., Loukanina, N., Ashihara, H., Yeung, E.C. and Thorpe, T.A. (2002) Pyrimidine nucleotide and nucleic acid synthesis in embryos and megagametophytes of white spruce (*Picea glauca*) during germination. *Physiol. Plant.* **115**, 155–165.
- Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe, T.A. and Ashihara, H. (2003) Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. J. Plant Physiol. 160, 1271–1295. https://doi.org/10.1078/0176-1617-01169.
- Su, C., Zhao, H., Zhao, Y., Ji, H., Wang, Y., Zhi, L. and Li, X. (2017) RUG3 and ATM synergistically regulate the alternative splicing of mitochondrial *nad2* and the DNA damage response in *Arabidopsis thaliana. Sci. Rep.* 7, 43897. https://doi.org/10.1038/srep43897.
- Sun, Q., Zybailov, B., Majeran, W., Friso, G., Olinares, P.D.B. and van Wijk, K.-J. (2009) PPDB, the plant proteomics database at Cornell. *Nucleic Acids Res.* 37, D969–D974.
- Valentin-Vega, Y.A., Maclean, K.H., Tait-Mulder, J., Milasta, S., Steeves, M., Dorsey, F.C., Cleveland, J.L., Green, D.R. and Kastan, M.B. (2012) Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia. *Blood*, **119**, 1490–5000. https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-373639.
- Vandepoele, K., Vlieghe, K., Florquin, K., Hennig, L., Beemster, G.T.S., Gruissem, W., Van de Peer, Y., Inze, D. and De Veylder, L. (2005) Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol.* **139**, 316–328. doi/10.1104/pp.105.066290.
- Wang, C. and Liu, Z. (2006) Arabidopsis ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development. *Plant Cell*, 18, 350–365. https://doi.org/10.1105/tpc.105. 037044.
- Wang, S., Bai, G., Wang, S., Yang, L., Yang, F., Wang, Y., Zhu, J.K. and Hua, J. (2016) Chloroplast RNA-binding protein RBD1 promotes chilling tolerance through 23S rRNA processing in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 12, e1006027. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006027.
- Witz, S., Jung, B., Fürst, S. and Möhlmann, T. (2012) *De novo* pyrimidine nucleotide synthesis mainly occurs outside of plastids, but a previously undiscovered nucleobase importer provides substrates for the essential salvage pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24, 1549–1559. https://doi. org/10.1105/tpc.112.096743.
- Wolcott, R.M. and Colacino, J.M. (1989) Detection of thymidine kinase activity using an assay based on the precipitation of nucleoside monophosphates with lanthanum chloride. *Anal. Biochem.* **178**, 38–40.
- Wong, T.S., Rajagopalan, S., Townsley, F.M., Freund, S.M., Petrovich, M., Loakes, D. and Fersht, A.R. (2009) Physical and functional interactions between human mitochondrial single-stranded DNA-binding protein and tumour suppressor p53. *Nucleic Acids Res.* 37, 568–581. https://doi.org/ 10.1093/nar/gkn974.
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C. and Sheen, J. (2013) Glucose-TOR signaling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496, 181–186. https://doi.org/10.1038/nature12030.
- Xu, J., Zhang, L., Yang, D.L., Li, Q. and He, Z. (2015) Thymidine kinases share a conserved function for nucleotide salvage and play an essential role in *Arabidopsis thaliana* growth and development. *New Phytol.* 208, 1089–1103. https://doi.org/10.1111/nph.13530.
- Yi, D., Alvim Kamei, C.L., Cools, T. et al. (2014) The Arabidopsis SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and SMR7 regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *Plant Cell*, 26, 296–309. https://doi.org/10.1105/tpc.113.118943.
- Yi, C., Tong, J., Lu, P. et al. (2017) Formation of a Snf1-Mec1-Atg1 module on mitochondria governs energy deprivation-induced autophagy by regulating mitochondrial respiration. Dev. Cell, 41, 59–71 e4. https://doi.org/ 10.1016/j.devcel.2017.03.007.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H. and Sheen, J. (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2, 1565–1572. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199.
- Yoo, S.-C., Cho, S.-H., Sugimoto, H., Li, J., Kusumi, K., Koh, H.-J., Iba, K. and Paek, N.-C. (2009) Rice virescent3 and stripe1 encoding the large and small subunits of ribonucleotide reductase are required for chloroplast biogenesis during early leaf development. *Plant Physiol.* **150**, 388–401.

- Yoshiyama, K., Conklin, P.A., Huefner, N.D. and Britt, A.B. (2009) Suppressor of gamma response 1 (SOG1) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106, 12843–12848. https://doi.org/10.1073/pnas.0810304106.
- Yoshiyama, K.O., Kobayashi, J., Ogita, N., Ueda, M., Kimura, S., Maki, H. and Umeda, M. (2013) ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in Arabidopsis. *EMBO Rep.* 14, 817– 822. https://doi.org/10.1038/embor.2013.112 embor2013112 [pii].

Roles of Arabidopsis thymidine kinase genes 17

- Yoshiyama, K.O., Kaminoyama, K., Sakamoto, T. and Kimura, S. (2017) Increased phosphorylation of Ser-Gln sites on SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1 strengthens the DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **29**, 3255–3268. https://doi.org/10.1105/tpc. 17.00267.
- Zrenner, R., Stitt, M., Sonnewald, U. and Boldt, R. (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 805–836.