

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE QUÍMICA

# CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS HEXOCINASAS DE MAÍZ EN PLANTAS DE ARABIDOPSIS QUE EXPRESAN A ZMHXK4-6 Y ZMHXK9

#### TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Químico Farmacéutico Biológico

#### PRESENTA:

Luis Enrique Morgado Martínez



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2020





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

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

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

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

### **JURADO ASIGNADO:**

PRESIDENTE:	Profesor: Jesus Fernando Montiei Aguirre
/OCAL:	Profesor: Sobeida Sánchez Nieto
SECRETARIO:	Profesor: Nuria Victoria Sánchez Puig
ler. SUPLENTE:	Profesor: Carmina Montiel Pacheco
2° SUPLENTE:	Profesor: Javier Axosco Marin
SITIO DONDE SE E	DESARROLLÓ EL TEMA:
_ABORATORIO 102 D	el Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de
Química <b>, UNAM</b>	
ASESOR DEL TEMA:	
ASESON DEL TEINIA.	
	Dra. Sobeida Sánchez Nieto
SUSTENTANTE:	
	Luis Enrique Morgado Martínez

ÍΝ	DI	CE
11.4	יט	CL

1. Abr	eviaturas.					•				1
2. Res	umen.		•			•				2
3. Inti	oducción.		•			•				3-22
3.1.		ón de la señal	de carb	ohidra	tos.					3-5
3.2.	-	con función				v HXK			·	5-22
	1. Proteí		Je11501 u			,	•	•	•	5-8
	2.1.1.	Generalidad	es	•	•	•	•	•	•	5
	2.1.2.	Estructura.	<b>.</b>	•	•	•	•	•	•	5-6
	2.1.3.	Funciones.	•	•	•	•	•	•	•	6-8
	2.1.3. 2. Cinasa		•	•	•	•	•	•	•	8-10
	2. Ciliasa 2.2.1.	Generalidad		•	•	•	•	•	•	8-10
	2.2.1. 2.2.2.	Estructura.	es.	•	•	•	•	•	•	8-9
	2.2.2. 2.2.3.	Funciones.	•	•	•	•	•	•	•	
				DK1		•	•	•	•	9-10
		ón entre las ci		-		•	•	•	•	10
		inasa, proteín		iligntin	_	•	•	•	•	11-22
	2.4.1.	Generalidad	es.	•	•	•	•	•	•	11-12
	2.4.2.	Estructura.	•	•	•	•	•	•	•	12
	2.4.3.	Localización.		•	•	•	•	•	•	13-15
		Hexocinasas	-		•	•		•	•	13-14
		Hexocinasas	•	•	•	•	•		•	14
	3.2.4.3.3.	Hexocinasas	•	•	•	•	•		•	14
	3.2.4.3.4.	Hexocinasas	tipo D.			•	•			15
3.	2.4.4.	La familia de	las hex	ocinas	as en p	lantas.				15-17
3.:	2.4.5.	Función.	•		•	•			•	17-22
	3.2.4.5.1.	Proteínas M	oonligh	ting.	•	•				17-19
	3.2.4.5.2.	Funciones M	loonligh	iting de	e la hex	ocinasa.			•	19-22
4. Just	tificación.		•		•	•			•	22-23
5. Hip	ótesis.		•	•	•	•	•		•	23
6. Obj	etivos.		•			•	•			23
6.1.	Objetivo	general								23
6.2.	-	particulares.								23
	-	imental.	•		•	•				24
	-	Métodos.	•		•	•	•		•	24-32
8.1.	•	vegetal			•					24-26
8.2.		n, cuantificac	ión v co				•	•	•	
	idad del R									26-27
8.3.		e cDNA	•				•	•	•	27
8.4.		ación de la ex	Inresión				•	•	•	۷,
		nediante PCR				, genes				27-29
8.5.		n y cuantifica						lc+	•	29-30
8.6.		n de proteína		•		-	_	.cai.	•	30
8.7.		éplica tipo We	_					•	•	30-31
						•			•	
8.8.	iviedición	de la longitu	u radicu	ııar.						31

8	9. Generación de gráficos y análisis estadístico		32
9.	Resultados		32-48
9.	. Comprobación de la expresión de las diferentes ZmHXKs.		32-34
	9.1.1. Comprobación de la presencia de ZmHXKs en plantas		
	complementadas mediante PCR		32
	9.1.2. Comprobación de la presencia de ZmHXKs en plantas		
	complementadas mediante Western Blot		32-33
	9.1.3. Comprobación de la ausencia de AtHXK1 en plantas		
	complementadas		34
9.	. Identificación de la ZmHXK sensora de la abundancia de glucosa	١.	34-48
	9.2.1. Determinación del fenotipo de las plantas		
	complementadas con ZmHXKs en medios suplementados		
	con glucosa		35-39
	9.2.2. Determinación del fenotipo de las plantas		
	complementadas con ZmHXKs en maceta		40-41
	9.2.3. Fenotipo de plantas gin 2-1 complementadas		
	con ZmHXKs en condiciones de día largo		42-45
	9.2.4. Determinación del efecto de la glucosa sobre		
	la expresión de los genes fotosintéticos en las plantas		
	complementadas		45-48
10.	Discusión		48-54
10	1. Confirmación de la complementación de plantas		
	2-1 con ZmHXKs		48-50
_	2. Fenotipo de las plantas gin 2-1 complementadas		
	n ZmHXKs		50-51
10	3. Fenotipo de insensibilidad a glucosa de las plantas		
	2-1 complementadas con las ZmHXKs mitocondriales		51-52
_	4. Las HXKs mitocondriales son HXKs sensoras		53-54
11.	Conclusiones		55
12.	Perspectivas		55
	Referencias		55-69
14.	Anexos		70-79
Ar	exo I Solución Hoagland		70
	exo II Composición del medio Murashige & Skoog		71
	exo III Composición del medio Gamborg		72
	exo IV Amortiguadores y soluciones para la elaboración		
	geles de agarosa		73
	exo V Amortiguadores y soluciones para extracción de		
	oteína total		74
•	exo VI Amortiguadores y soluciones para elaboración de		
	es de acrilamida-SDS y tinción con azul de Coomasie		75-76
_	exo VII Amortiguadores y soluciones para inmunoréplica		
	o Western		77
	exo VIII Registro fotográfico del crecimiento de plántulas		
	los seis genotipos en los diferentes medios y bajo los dos		
	erentes tratamientos a los cuatro v siete días de crecimiento.		78-80

#### **ÍNDICE DE FIGURAS**

FI	Gl	IR	Δ	ς
Г	G	JN	~	3

<b>Figura 1.</b> Estructura del complejo heterotrimérico de SnRK1		6
Figura 2. Funciones de SnRK1		7
Figura 3. Predicción de la estructura cristalográfica de		
la región C-terminal de AtTOR y organización del complejo		
conservado TORC1		9
Figura 4. Funciones de TOR	•	10
<b>Figura 5.</b> Reacción de fosforilación de β-D-glucosa catalizada		
por la hexocinasa.	•	11
Figura 6. Estructuras cristalográficas de AtHXK1 sin ligando y		40
unida a glucosa.	•	13
Figura 7. Localización celular de las hexocinasas en plantas	•	15 20
<b>Figura 9.</b> Papel de la glucosa y sus análogos no metabolizables	•	20
con HXK1 silvestre y con HXKs mutadas en aminoácidos catalíticos.		21
<b>Figura 10.</b> Diagrama de flujo de la metodología experimental llevada a cabo.	•	24
Figura 11. Corrimiento electroforético del producto de PCR para	•	2-1
cada una de las ZmHXKs presentes en las plantas gin 2-1		
complementadas con ZmHXK1		32
Figura 12. Identificación de las HXKs recombinantes en las seis		
diferentes líneas de plantas utilizadas		33
Figura 13. Corrimiento electroforético del producto de PCR para AtHXK1.		34
Figura 14. Longitud radicular de las plántulas a diferentes		
tiempos y en tres diferentes medios		37-39
Figura 15. Fenotipo de las plantas silvestres y mutantes crecidas en maceta.		40
Figura 16. Fenotipo de las plantas silvestres y mutantes crecidas en maceta.		41
Figura 17. Fenotipo de las plantas silvestres y mutantes crecidas en		
maceta crecidas en condiciones de luz prolongada		44
Figura 18. Fenotipo de las plantas silvestres y mutantes crecidas en placa		
en condiciones de luz continua		47
Figura 19. Corrimiento electroforético de los productos de PCR para los		
genes fotosintéticos analizados		48
Figura 20. Registro fotográfico del crecimiento de plántulas de los		
seis genotipos en los diferentes medios y bajo los dos diferentes		
tratamientos		78-80

#### **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Diferentes sustratos de la hexocinasa y sus respectivas Km.	•	12
Tabla 2. Ejemplos de función y organismos en los cuales se		
encuentran proteínas moonlighting	•	18-19
Tabla 3. Condiciones para la síntesis de cDNA		27
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos utilizados para la Reacción en Cadena de		
la Polimerasa	•	28
Tabla 5. Condiciones utilizadas para la Reacción en Cadena de la		
Polimerasa para los genes CAA, CAB, UBQ, ZmHXK4, ZmHXK5,		
ZmHXK6 y ZmHXK9.     .      .      .      .     .     .     .     .     .		28
Tabla 6. Condiciones utilizadas para la Reacción en Cadena de la		
Polimerasa para el gen AtHXK1		29
Tabla 7. Efecto de diferentes medios en el crecimiento		
radicular de las plantas de Arabidopsis silvestres (wt), gin 2-1		
y complementadas con ZmHXKs (comp) crecidas por 7 días.		36
Tabla 8. Macronutrientes y micronutrientes usados para		
la preparación de solución Hoagland		70

#### 1. Abreviaturas

2DOG 2-deoxiglucosa
3OMG 3-O-metilglucosa
6DOG 6-deoxiglucosa
aa Aminoácido

AMPK Proteína Cinasa Activada por AMP

APS Persulfato de amonio

AtHXK1 Hexocinasa 1 de *Arabidopsis thaliana* 

BCIP Sal de p-toluidina y 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato

CAA Anhidrasa Carbónica

CAB Proteína de Unión a Clorofila a/b
DNA Ácido Desoxirribonucleico

FRK Fructocinasa

FT Factor de Transcripción G6P Glucosa-6-fosfato

GK Glucocinasa Glc Glucosa

HKL Hexocinasa-Like

HMG-CoAr 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa

HXK Hexocinasa

LST8 Letal con SEC13 proteína 8

Man Manosa

mRNA RNA mensajero

NBT Cloruro de nitro azul de tetrazolio

NR Nitrato Reductasa

NtHXK Hexocinasa de Nicotiana tabacum
OsHXK Hexocinasa de Oryza sativa
PBS Amortiguador salino de fosfatos
PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa
RAPTOR Proteína Regulatoria Asociada a TOR

RNA Ácido Ribonucleico

RPT5B Partícula regulatoria 19S del proteasoma

SBP Sedoheptulosa bifosfatasa SDS Dodecil sulfato de sodio

SIHXK Hexocinasa de *Solanum lycopersicum*SNF1 Proteína 1 no fermentadora de sacarosa
SnRK1 Proteína cinasa relacionada a SNF1
TEMED N, N, N', N' – tetrametiletilendiamina

Tris Trishidroximetilaminometano

tRNA RNA de transferencia

UBQ Ubiquitina

VHA-B1 Subunidad B1 de la H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar

ZmHXK Hexocinasa de *Zea Mays* 

#### 2. Resumen

Las Hexocinasas (HXKs) son principalmente conocidas por catalizar la fosforilación de la glucosa en la posición seis, el primer paso de la glucólisis. Sin embargo, esta no es su única función; estas proteínas, denominadas moonlighting, también son capaces de percibir la abundancia de glucosa y modificar la expresión de genes, algunos de ellos (como *CAB2*) involucrados en la fotosíntesis.

La existencia de una planta de *Arabidopsis thaliana* insensible a glucosa que cuando es crecida en un medio sin nitratos y con una alta concentración de glucosa, no presenta retraso en el crecimiento; tiene hojas verdes y una raíz larga, nombrada gin 2-1, y el conocimiento de que la HXK1 (AtHXK1) de esta misma planta es una hexocinasa moonlight, hizo posible evaluar la capacidad sensora de HXKs de otras plantas como OsHXK5, OsHXK6 y NtHXK1, esto mediante la complementación de plantas gin 2-1 con cada uno de los genes de estas HXKs.

Previamente, en el grupo de trabajo se habían producido plantas mutantes gin 2-1 complementadas con seis de las nueve HXKs de maíz (ZmHXK4-ZmHXK9). En este trabajo se corroboró que eran gin 2-1 complementadas al determinar la ausencia de AtHXK1 y la presencia de las ZmHXKs. Posteriormente se evaluó la capacidad de las ZmHXK4-6 y ZmHXK9 (hexocinasas mitocondriales) de sensar glucosa y también se registró su fenotipo cuando estas fueron crecidas en dos diferentes condiciones de luz: fotoperiodo corto y largo; en glucosa y manitol (al 2% y 6%); y en tres diferentes medios: agar, medio Gamborg y MS. Se utilizaron únicamente las plantas gin 2-1 complementadas con las ZmHXKs anteriormente mencionadas debido a que todas las HXKs que se han identificado como sensores de glucosa tienen localización mitocondrial, excepto la HXK7 de arroz.

El fenotipo de las plantas crecidas en caja bajo un fotoperiodo corto mostraron un patrón de crecimiento diferente a la planta gin 2-1; las plantas crecidas en Gamborg y MS son totalmente diferentes a las plantas crecidas en agar; las plantas crecidas en ambos medios presentan una longitud radicular mayor e incluso una mayor cantidad de tejido aéreo, debido probablemente a la composición rica en minerales y vitaminas de cada uno de los medios. Por otro lado, se hicieron crecer plantas en maceta bajo fotoperiodo corto, pero las diferencias fonotípicas entre las plantas se observan mejor cuando estas son crecidas en fotoperiodo largo. Además, se demostró que las ZmHXK4-6 y 9 son HXKs sensoras, debido a que se observó que cuando las plantas complementadas con ZmHXKs crecen en presencia de glucosa al 6 %, estas presentan un retardo en el crecimiento, coloración morada y mediante PCR se comprobó que la expresión de los genes *CAA*, *CAB* y *SBP* se redujo.

#### 3. Introducción

Todas las plantas, las algas y algunos procariontes pueden utilizar directamente la energía luminosa para sintetizar compuestos orgánicos en un proceso llamado fotosíntesis. En plantas superiores, el dióxido de carbono utilizado durante el Ciclo de Calvin es metabolizado para proveer energía y esqueletos de carbono para el crecimiento de la planta, o es exportado principalmente en forma de sacarosa, hacia otros tejidos para mantener el desarrollo o sintetizar polisacáridos de reserva. De acuerdo con su dependencia por sacarosa, los tejidos vegetales se dividen en fuente y demanda [Turgeon, 1989].

Los tejidos fuente son usualmente fotosintéticamente activos, como las hojas maduras, aunque en algunas plantas las raíces son fotosintéticas. Por el otro lado los tejidos demanda no son fotosintéticos y dependen de los tejidos fuente para satisfacer su demanda de nutrientes, entre estos se incluyen a raíces, flores, semillas en desarrollo y el tallo [Turgeon, 1989; Leegood, 2004]. Sin embargo, esta clasificación no es estática para un tejido, sino que depende de su estadio de desarrollo y de cambios en las condiciones ambientales, es decir, hay tejidos que en una etapa del desarrollo son tejidos demanda y en otras son tejido fuente, como el endospermo que es un tejido demanda durante la embriogénesis de la semilla, pero en la germinación, es un tejido fuente.

Además, la interacción entre ambos tejidos es crítica para que la planta pueda responder y adaptarse a la abundancia o escasez de recursos. Los procesos que deben estar coordinado entre ambos tejidos para un óptimo crecimiento de la planta es la producción de carbohidratos, su movilización, localización y utilización, lo cual se logra cambiando la expresión de los genes, muchos de ellos denominados genes responsivos a carbohidratos [Scott, 2008].

#### 3.1. Percepción de la señal de carbohidratos

La síntesis de carbohidratos en las plantas únicamente se lleva a cabo en los tejidos fotosintéticos, pero estos no solo sintetizan la cantidad necesaria para satisfacer su propia demanda, también sintetizan un excedente para satisfacer el requerimiento de

los tejidos demanda. Por lo anterior debe existir una regulación muy fina para el reparto de azúcares dependiendo del estado del desarrollo y de las necesidades metabólicas del propio tejido.

Durante la fotosíntesis, el CO<sub>2</sub> es utilizado para sintetizar triosas fosfato [Rolland *et al.*, 2006], y estas a su vez, se emplean en la síntesis de almidón (como nutriente de reserva) y de otros carbohidratos como la glucosa, sacarosa y fructosa, que sirven como esqueletos carbonados para sintetizar aminoácidos, ácidos grasos y pared celular, entre otros [Smeekens, 1998]. Adicionalmente, los carbohidratos afectan el crecimiento y desarrollo de la planta tanto de manera directa como indirecta; en el primer caso al proveer de energía después de ser catabolizados y en el segundo regulando diversas vías de señalización que incluyen la señalización dependiente de luz [Smeekens, 2000], hormonas [León & Sheen, 2003] y señalización por nitrógeno [Coruzzi & Zhou, 2001].

Originalmente se planteaba que los efectos de los carbohidratos en la fotosíntesis, el crecimiento y desarrollo eran resultado indirecto del metabolismo. Sin embargo, en 1990 se demostró que la glucosa aplicada a protoplastos de maíz llevaba a la represión de genes fotosintéticos [Sheen, 1990]. Desde entonces, varias aproximaciones genéticas han sido utilizadas para definir las vías de señalización por azúcares, así como para identificar sus componentes [Rook & Bevan, 2002; Gibson, 2000]. Los carbohidratos más estudiados cuyos efectos repercuten en la transcripción de genes de varios cientos de genes son la glucosa, la fructosa y la sacarosa [Kunz et al., 2004; Thum et al., 2004; Villadsen & Smith, 2004]. Además, la expresión de un gen determinado puede ser modificada por más de un carbohidrato [Kunz et. al., 2014].

Tan solo en el caso de la glucosa, se ha descrito que a diferentes concentraciones puede modificar la expresión de alrededor de dos mil genes [Xiong, 2013]. Entre los genes cuya expresión se modifica están algunos relacionados con el crecimiento de la planta, la fotosíntesis [Rolland *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2012], la germinación [Gibson, 2000; 2005; Price *et al.*, 2004], la floración [Smeekens *et al.*, 2009; Moghaddam & Van den Ende, 2013] y la senescencia [Wingler *et al.*, 2009; Sami *et al.*, 2016]. En cuanto a la fotosíntesis, algunos de los genes afectados son los que codifican para la anhidrasa

carbónica (*CAA*), la proteína de unión a clorofila (*CAB2*), la sedoheptulosa bifosfatasa (*SBP*) y la subunidad pequeña de la ribulosa fosfato descarboxilasa (*RuBP*) [Nielsen *et al.,* 1998].

Así, los azúcares no son solo necesarios como fuente de energía, esqueletos carbonados y como componentes estructurales, además están implicados en la regulación genética de procesos relacionados con el crecimiento y senescencia de las células vegetales, lo que lleva a preguntarse ¿cómo es que carbohidratos como la glucosa son capaces de ejercer su función señalizadora? Diferentes estudios apuntan a que al menos tres proteínas están involucradas en la percepción de carbohidratos: SnRK1, TOR y la Hexocinasa (HXK). A continuación, se describirá la función sensora de cada una, pero de forma más detallada de la HXK.

#### 3.2. Proteínas con función sensora: SnRK1, TOR y HXK

#### 3.2.1. Proteína SnRK1

#### 3.2.1.1. Generalidades

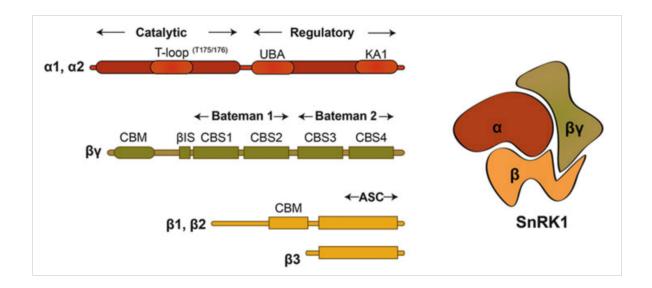
La proteína SnRK1 (SNF1 – Related Protein Kinase – 1), identificada por primera vez en endospermo de centeno [Alderson *et al.*, 1991], es una proteína cinasa presente en plantas, es el homólogo de la proteína SNF1 de levaduras y de la proteína AMPK en animales [Halford *et al.*, 2003], con las que comparte un 48% de identidad en su secuencia de aminoácidos y hasta 65% en su dominio cinasa [Polge & Thomas, 2006]

#### 3.2.1.2. Estructura

En plantas, la proteína SnRK1 es un heterotrímero compuesto por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\beta\gamma$  (Figura 1), de las cuales la primera es catalítica y las dos restantes son regulatorias [Polge & Thomas, 2006]. Además, tanto en plantas como en levaduras y en animales, existen diversas isoformas de cada subunidad; las subunidades con isoformas en plantas son  $\alpha$  y  $\beta$ , denominadas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$  [Emanuelle, 2016].

En *Arabidopsis thaliana*, los homólogos de SnRK1 son conocidos como KIN10 (SnRK1.1) y KIN11 (SnRK1.2) y solo varían en la subunidad catalítica  $\alpha$  [Sakr *et al.*, 2018]. Las subunidades alfa están formadas por un dominio catalítico N-terminal, seguido por

regiones que regulan la actividad cinasa y las interacciones con las subunidades beta y gamma [Hardie et~al., 2012]. Las subunidades beta tienen una región N-terminal variable, la cual está N-miristoilada, un módulo de unión a carbohidrato (CBM) y un dominio C-terminal que se une a las otras subunidades [Iseli et~al., 2005]. Por último, las subunidades gamma o también denominada  $\beta\gamma$ , tienen cuatro motivos de cistationina- $\beta$ -sintasa en tándem, los cuales regulan la actividad catalítica de alfa [Mayer et~al., 2011].

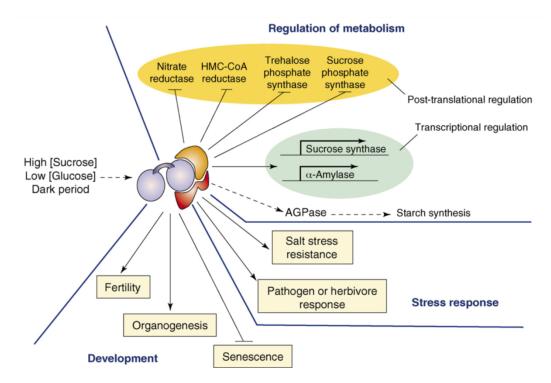


**Fig. 1. Estructura del complejo heterotrimérico de SnRK1** | La subunidad  $\alpha$  (en rojo) se compone del dominio catalítico *T-loop*, y un dominio regulatorio que incluye el dominio de asociación a ubiquitina (UBA) y uno para unirse a  $\beta$  y  $\gamma$  (KA1). El domino  $\beta\gamma$ , contiene dos dominios *Bateman* (así llamados por la primera persona que los caracterizó, Alex Bateman [Bateman, 1997]), cada uno con dos motivos de cistationina- $\beta$ -sintasa (CBS) y una secuencia de interacción con  $\beta$  ( $\beta$ IS). El dominio  $\beta$  contiene el módulo de unión a carbohidrato (CBM). Tomado de Margahla, 2016.

#### **3.2.1.3.** Funciones

La proteína SnRK1 tiene un papel en las vías de señalización metabólica, hormonal y por estrés que se ha propuesto es desencadenada por la escasez de glucosa, la alta concentración de sacarosa o un periodo de oscuridad (Figura 2) [Baena-González, 2007; Baena-González & Sheen, 2008; Halford & Hey, 2009]. SnRK1 es capaz de inactivar por fosforilación a enzimas como la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A [Dale *et al.*, 1995a; 1995b], nitrato reductasa [Sudgen *et al.*, 1999], sacarosa fosfato sintetasa [Purcell *et al.*, 1998], trehalosa-6-fosfato sintasa y piruvato cinasa [Beczner *et al.*, 2010]. Además de la

regulación enzimática directa, SnRK1 controla la homeostasis energética desencadenando una reprogramación transcripcional; induce más de 300 genes involucrados en el catabolismo de los aminoácidos, la hidrólisis de sacarosa y almidón, movilización de lípidos y la β-oxidación [Baena-González, 2007; Baena-González & Sheen, 2008]. También se ha encontrado que reguladores transcripcionales y factores de remodelación de la cromatina son regulados a nivel transcripcional por la SnRK1. Igualmente, las condiciones ambientales adversas como la sequía, temperaturas extremas, periodos de oscuridad prolongados, contaminantes e inundaciones tienen la capacidad de disminuir los niveles energéticos y activar la señalización por SnRK1 [Margahla *et al.*, 2016].



**Fig. 2. Funciones de SnRK1** | SnRK1 tiene un papel en el desarrollo, respuesta a estrés y en la regulación del metabolismo. Tomado de Polge & Thomas, 2006.

La evidencia sugiere que SnRK1 está implicada en la percepción y señalización por azúcares; por un lado, la activación de SnRK1 por diferentes tipos de estrés que convergen como una señal de déficit de energía puede ser bloqueada suministrando glucosa o sacarosa [Baena-González et al., 2007]. Además, el perfil transcripcional inducido por la activación de SnRK1 se sobrelapa con aquel obtenido en condiciones de inanición

[Contento et al., 2004; Thimm et al., 2004] y es contrario al perfil obtenido en presencia de glucosa [Palenchar et al., 2004; Price et al., 2004]. También se ha demostrado que plantas que sobreexpresan de SnRK1.1 crecidas en concentraciones de glucosa mayores al 4% muestran importantes alteraciones en el desarrollo, que la actividad cinasa de SnRK1.1 aumenta cuando plantas silvestres y mutantes que sobreexpresan de esta cinasa son crecidas en glucosa al 6 %, además de que el desarrollo de las plantas sobreexpresoras se detuvo justo después de la germinación. Además, la evidencia sugiere que la activación de SnRK1 es específica para glucosa, ya que cuando se hicieron crecer plantas transgénicas y silvestres en palatinosa (análogo no metabolizable de la sacarosa), no se observó diferencia [Jossier et al., 2009].

#### 3.2.2. Cinasa TOR

#### 3.2.2.1. Generalidades

TOR (*Target of Rapamycin*) es una proteína cinasa de Serina/Treonina que pertenece a la familia PIKK (*Phosphatidylinositol Kinase* – *Related Kinases*) [Wullschleger *et al.*, 2006], identificada por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* y que responde a la abundancia de nutrientes [Heitman *et al.*, 1991]. TOR es una cinasa conservada en todos los organismos eucariontes; en plantas, TOR solo se ha identificado formando parte del complejo TORC1 [Sakr, 2018].

#### 3.2.2.2. Estructura

En *A. thaliana*, a diferencia de otros organismos, solo se ha encontrado una proteína TOR (AtTOR), la cual se compone de 2481 aminoácidos y el alineamiento de su secuencia muestra que es homóloga a mTOR (TOR de mamíferos) y a TOR de *S. cerevisiae* [Menand *et al.*, 2002]. El dominio cinasa de AtTOR tiene al menos veinte repeticiones HEAT, los cuales regulan las interacciones proteína-proteína, seguidos por los dominios FAT, FRB y FATC (Figura 3) [John *et al.*, 2011].

La cinasa TOR se asocia con las proteínas RAPTOR y LST8 para formar el complejo TORC1 [Dobrenel *et al.*, 2016]. El análisis de la estructura de TORC1 ha demostrado que la

región N-terminal de TOR interactúa con las repeticiones WD40 de RAPTOR [Adami *et al.*, 2007; Yip *et al.*, 2010], mientras que la parte C-terminal, donde se encuentran los dominios FAT, FRB, FATC son las que interactúan con LST8 [Yang *et al.*, 2013] LST8 es necesaria para activar a TOR.

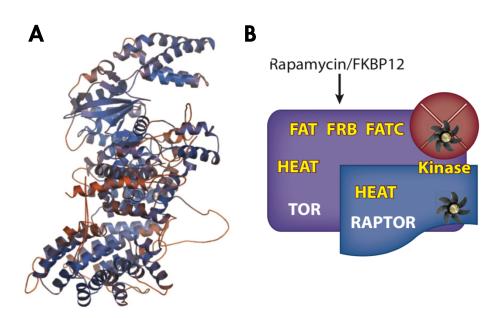


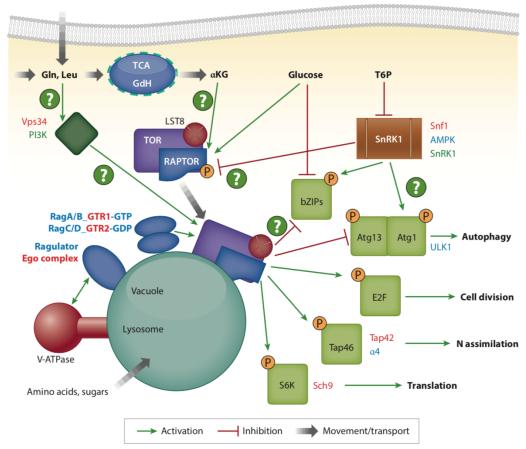
Fig. 3. Predicción de la estructura cristalográfica de la región C-Terminal de AtTOR (A) y Organización del complejo conservado TORC1 (B) | La predicción de la estructura está basada en el modelo tridimensional de TOR de humano. Se muestra la estructura de propela de WD40 en LST8 (disco rojo) y RAPTOR. Tomado de Dobrenel, 2016.

#### **3.2.2.3.** Funciones

La actividad de cinasa TOR está implicada en la respuesta a la abundancia de nutrientes y participa en una gran variedad de procesos biológicos (Figura 4), desde la regulación del ciclo celular [Xiong et al., 2013] hasta la autofagia [Moreau et al., 2012]. Además, promueve la biogénesis ribosomal y la traducción de proteínas [Xiong et al., 2013], el metabolismo del nitrógeno [Marchive et al., 2013; Medici & Krouk, 2014], de lípidos [Caldana et al., 2013] y carbohidratos como el almidón [Laurie et al., 2003], las rafinosas, la trehalosa [Osuna et al., 2007] y el mioinositol [Dobrenel et al., 2013; Rexin et al., 2015].

Plántulas tratadas con glucosa 15 mM presentan una inducción de la expresión de 1318 genes, mientras que la de otros 1050 se reduce [Ren *et al.*, 2012; Caldana *et al.*,

2013] Lo anterior no ha sido posible de replicar utilizando otros carbohidratos como fructosa, xilosa y galactosa y tampoco con aminoácidos, sugiriendo que solo la glucosa es el principal mediador de la regulación de genes a través de la vía TOR [Xiong *et al.*, 2013].



**Fig. 4. Funciones de TOR |** Modelo simplificado de la regulación por TOR mediada por nutrientes. Se muestran las diferentes formas en las que los nutrientes regulan a la cinasa TOR, así como sus interacciones. Los nombres para las proteínas para animales, levaduras y plantas se muestran en azul, rojo y verde, respectivamente. Tomado y modificado de Dobrenel, 2016.

#### 3.2.3. Relación entre las cinasas SnRK1 y TOR

SnRK1 y TOR son reguladores clave que vinculan el desarrollo y crecimiento con el estado energético y nutricional de las plantas; mientras que TOR promueve el crecimiento en respuesta a altas concentraciones de azúcares [Deprost *et al.,* 2007], SnRK1 está particularmente activa durante la deprivación de azúcares. Ambas cinasas están activas a lo largo del ciclo de vida de las plantas y son esenciales para su supervivencia bajo condiciones de estrés [Baena-González, 2010; Lastdrager *et al.,* 2013]

#### 3.2.4. Hexocinasa, proteína moonlighting

#### 3.2.4.1. Generalidades

Las HXKs (EC 2.7.1.1) pertenecen al grupo de las transferasas de grupos fosfato que tienen como grupo aceptor un grupo hidroxilo (–OH). Estas enzimas están presentes en todos los organismos, aunque su peso molecular, distribución celular y propiedades cinéticas difieren [Cárdenas *et al.*, 1998]. La reacción que catalizan es la siguiente:

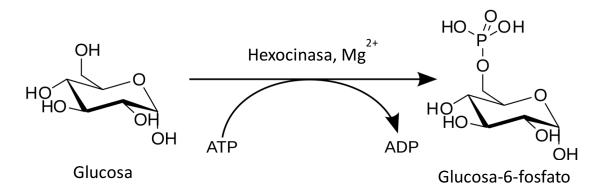


Fig. 5 Reacción de fosforilación de glucosa catalizada por la hexocinasa.

La HXK fue descrita por primera vez por Otto Meyerhof en 1927 [Meyerhof, 1927], una década después se dilucidó que era una enzima capaz de fosforilar hexosas utilizando ATP como donador de fosfato (Figura 5). El conocimiento de la existencia de una ruta metabólica glucolítica en animales (Embden-Meyerhor-Parnas) que utilizaba G6P, trajo consigo el interés por demostrar la existencia de HXKs en plantas. Finalmente, en 1953, una HXK fue caracterizada en trigo [Saltman, 1953], proporcionando evidencia de su existencia en plantas.

En plantas la HXK es capaz de fosforilar no solo a la D-glucosa, sino también a varias hexosas diferentes como la D-fructosa, la D-manosa y D-galactosa, utilizando casi exclusivamente ATP. Es necesario destacar que en plantas no se ha encontrado una enzima que fosforile únicamente glucosa (Glucocinasa o GK), aunque las HXKs tienen una mayor afinidad por glucosa que por otras hexosas [Claeyssen & Rivoal, 2007], como se observa en la tabla 1. Hay que mencionar también, que la familia de las HXKs contiene

miembros que carecen de actividad catalítica, a pesar de tener una similitud estructural alta con las que sí presentan actividad, por ello se les denomina HKL.

**Tabla 1** | Diferentes sustratos de la hexocinasa y sus respectivas Km. Tomado y modificado de Claeyssen & Rivoal, 2007.

Sustrato	K <sub>m</sub> (mM)
D-Glucosa	0.02 – 0.13
D-Fructosa	1.50 – 30.00
D-Manosa	0.02 – 0.50
ATP	0.05 – 0.59
UTP	1.30 – 4.50
GTP	0.75 – 2.20
СТР	1.00 – 3.20
TTP	0.23

#### 3.2.4.2. Estructura

En la estructura cristalográfica de AtHXK1 (Figura 6) se observa que la enzima consiste en catorce hélices alfa, cinco hélices 3<sub>10</sub> y doce láminas beta acomodados en dos dominios; un dominio grande en forma oval (residuos 30-85 y 229-473) y un dominio pequeño (residuos 94-228 y 479-496). Estos dominios están unidos por bisagras flexibles (residuos 86-93 y 474-478), separados por una hendidura para la unión del sustrato [Feng et al., 2015].

Los residuos involucrados en la unión a glucosa están conservados en todas las HXKs y GKs y estos son diferentes a las FRKs. El mecanismo catalítico de unión de la glucosa a AtHXK1 es similar al descrito en levadura [Aleshin *et al.*, 1998] [Kuettner *et al.*, 2010]. El residuo de AtHXK1 que se une a glucosa es el Asp230, que además está implicado en la catálisis, mientras que Gly104 es responsable de unirse al ATP y Ser177 está involucrado en la transferencia del grupo fosforilo [Kraakman *et al.*, 1999].

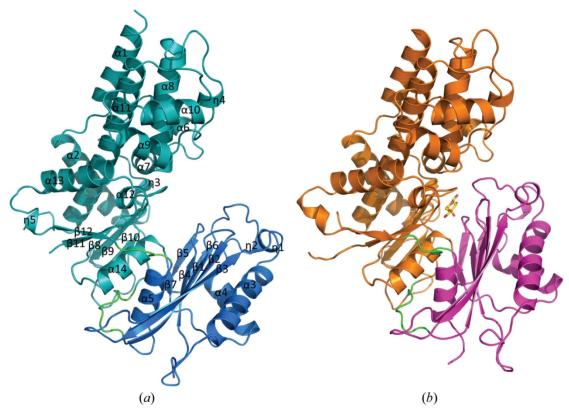


Fig. 6. Estructuras cristalográficas de AtHXK1 sin ligando (a) y unida a glucosa (b) | Representación de AtHXK1 sin ligando. El dominio grande se muestra en color verde oscuro y el dominio pequeño en color azul. Se muestran también las estructuras secundarias características. (a). Representación de AtHXK1 con glucosa. El dominio grande se muestra en color naranja y el dominio pequeño en color magenta. La glucosa se representa en modelo de líneas y las regiones bisagra se muestran en verde (a y b). Tomado de Feng, 2015.

#### 3.2.4.3. Localización

Las plantas poseen cuatro tipos diferentes de HXKs, basadas en la secuencia de su región N-terminal, la cual determina su localización subcelular, designadas A-D [Aguilera-Alvarado & Sánchez-Nieto, 2017], según se muestra en la Figura 7.

#### 3.2.4.3.1. Hexocinasas tipo A

Las hexocinasas tipo A tienen una secuencia hidrofóbica de 30 aminoácidos en la región N-terminal, la cual sirve como péptido señal para dirigirlas al cloroplasto. Este tipo de HXKs se han encontrado en algunas plantas y en el musgo *Physcomitrella patens* [Wiese *et al.*, 1999; Zhong *et al.*, 2010]. Las plantas con metabolismo C<sub>4</sub> tienen este tipo de enzima, aunque se predice que OsHXK4 se encuentra en el cloroplasto, pese a que es

una planta con metabolismo C<sub>3</sub> [Aguilera-Alvarado *et. al.*, 2019]. Se cree que este tipo de HXKs pueden estar involucradas en la fosforilación de la glucosa para la síntesis de almidón, de ácidos grasos o entrar a la vía de las Pentosas Fosfato [Cho, 2006] [Kandel - Kfir, 2006].

#### 3.2.4.3.2. Hexocinasas tipo B

Estas proteínas poseen una secuencia de anclaje a la membrana externa mitocondrial conformado por aproximadamente 24 aminoácidos. Algunos miembros de esta familia se han encontrado localizados no solo en la mitocondria, sino también en el núcleo [Cho et al., 2006; Cho et al., 2009; Hernández-Loyola, 2019]. Debido a su ubicación mitocondrial, se ha planteado que estas HXKs fosforilan a la glucosa para su inmediata incorporación a las diferentes vías metabólicas y permiten usar de una manera eficiente el ATP recién exportado de la mitocondria y el regreso del ADP al organelo [Alcántar-Aguirre et. al., 2013]. AtHXK1 se encontró en el núcleo formando un complejo con otras dos proteínas que no tienen relación con su actividad de fosforilación de hexosas, sino formando un complejo represor de los genes fotosintéticos [Cho et al., 2006]. Se desconoce cómo el complejo llega al núcleo y cómo la HXK se transloca de la mitocondria al núcleo. AtHXK1 no es la única HXK que se ha encontrado en el núcleo [Cho et al., 2006], también OsHXK5, OsHXK6 [Cheng et al., 2009] y ZmHXK6 [Hernández-Loyola, 2019], por lo que se sugiere que el mecanismo de formación del complejo represor podría estar conservado.

#### 3.2.4.3.3. Hexocinasas tipo C

Este tipo de cinasas no tiene péptido señal por lo que se encuentran en el citosol donde son capaces de fosforilar la glucosa que proviene de la degradación del almidón [Nilsson, 2011]. Solo están presentes en monocotiledóneas [Karve, 2010; Aguilera-Alvarado et al., 2019].

#### 3.2.4.3.4. Hexocinasas tipo D

Este último tipo de hexocinasas, al igual que las HXKs tipo B se encuentran en la mitocondria y tienen una secuencia de anclaje a la mitocondria de aproximadamente 24 aminoácidos, más no la misma secuencia. Solo han sido encontradas en el musgo *Physcomitrella patens* [Nilsson, 2011].

HXK tipo A

HXK tipo B

HXK tipo C

HXK tipo D

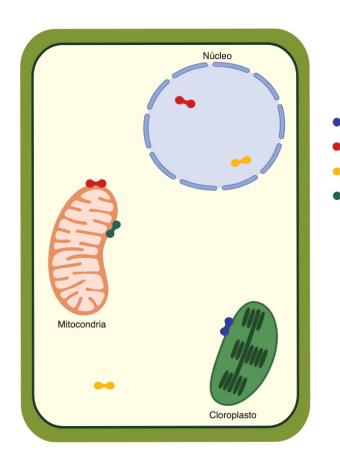


Fig. 7. Localización celular de las hexocinasas en plantas | Con base en la secuencia N-terminal las hexocinasas se clasifican en cuatro tipos: A, B, C y D. Las HXKs tipo A se encuentran en el cloroplasto, las tipo B en la mitocondria, pero son capaces de traslocarse al núcleo, las tipo C son proteínas citosólicas y las tipo D solo se encuentran en las mitocondrias. Tomada modificado de Aguilera-Alvarado, 2019a.

#### 3.2.4.4. La familia de las hexocinasas en plantas

La familia de las HXKs en plantas es muy diversa; por ejemplo, en *Arabidopsis* thaliana está formada por seis proteínas [Karve et. al., 2008], en *Oryza sativa* por diez [Cho et. al., 2006], en *Solanum lycopersicum* por cuatro [Kandel-Kfir et. al., 2006], en *Triticum aestivum* por 26 HXKs putativas (archivo suplementario en Aguilera-Alvarado et. al., 2019) y en *Zea mays* por nueve [Zhang et al., 2014; Aguilera-Alvarado et al., 2019].

En *A. thaliana* solo tres de las seis HXKs tienen actividad catalítica (HXK1-3) mientras que las tres restantes son HKL (HKL1-3). HXK1 es una hexocinasa tipo B capaz de

translocarse al núcleo, mientras que AtHXK3 es cloroplástica y de las cuatro proteínas restantes no se tiene información respecto a su localización subcelular [Karve *et al.*, 2008] [Aguilera-Alvarado & Sánchez-Nieto, 2017]

Por su parte, en *O. sativa*, nueve de las diez HXKs (OsHXK2-10) poseen una estructura genómica altamente conservada: nueve exones y ocho intrones, mientras que OsHXK1 tiene un único exón. Del análisis del perfil de expresión de genes en arroz, se encontró que a excepción de OsHXK1 y OsHXK10, estos se expresan prácticamente en todos los tejidos, mientras que OsHXK10 es polen-específica [Cho *et al.*, 2006]. En cuanto a su localización subcelular, OsHXK1, OsHXK7 y OsHXK8 son HXK tipo C, OsHXK4 es del tipo A y las seis restantes son del tipo B [Cheng *et al.*, 2011], siendo únicamente OsHXK5 y OsHXK6 capaces de traslocarse al núcleo [Cho *et al.*, 2009] aunque el mecanismo de translocación aún se desconoce.

*S. lycopersicum* tiene cuatro HXKs pero solo se sabe que SlHXK1 es una HXK tipo B y SlHXK4 es del tipo A [Dai *et al.*, 2002; Damari-Weissler *et al.*, 2006].

Karve *et al.*, 2010 y Zhang *et al.*, 2014 mediante un análisis *in silico* predijeron que la familia de las HXKs en *Z. mays* contenía seis HXKs catalíticas y tres no catalíticas y con localización subcelular citosólica, mitocondrial y cloroplástica. Sin embargo, el *análisis in silico* realizado por Aguilera-Alvarado y colaboradores (2019), no predijo ninguna cloroplástica. Adicionalmente, Aguilera-Alvarado y colaboradores (2019) demostraron que ZmHXK4-9 sí tienen actividad catalítica, aun cuando ZmHXK9 tiene una actividad marginal. Las ZmHXKs tienen preferencia como sustrato a la manosa, luego glucosa y después fructosa. De hecho, para ZmHXK8 no fue posible obtener su K<sub>m</sub> para fructosa ya que aún no alcanzaba la V<sub>max</sub> a concentraciones de 100 mM y su K<sub>m</sub> para glucosa está en el rango mM (Km 4.7 mM). Mientras que ZmHXK4, 5, 6 y 7 presentaban una K<sub>m</sub> similar para glucosa entre 66 y 195 μM, y diferían en la K<sub>m</sub> para ATP, ZmHXK4, 5 y 6 con una K<sub>m</sub> de 135 a 199 μM, mientras ZmHXK7 es más afín con una K<sub>m</sub> de 29 μM. Una diferencia adicional fue su ubicación en la célula, ZmHXK4-6 y ZmHXK9 son mitocondriales y ZmHXK7 y ZmHXK8 citosólicas. No hubo ZmHXK cloroplástica. Hernández-Loyola (2019) encontró que ZmHXK4-6 tienen una secuencia presuntamente de localización nuclear, adyacente a la

secuencia de anclaje a la mitocondria. La remoción de la secuencia de anclaje a la mitocondria permite a ZmHXK6 que se encuentre en el núcleo (Hernández-Loyola, 2019), aún no se demuestra si ZmHXK4 y ZmHXK5 también pueden localizarse en el núcleo, aunque en su secuencias también presentan una secuencia putativa de localización nuclear. Es posible que las HXKs en maíz no sean redundantes.

#### 3.2.4.5. Función

Como ya se mencionó anteriormente, las HXKs son capaces de fosforilar hexosas, mostrando diferente afinidad por cada una de ellas, sin embargo, también se ha demostrado que estas proteínas son capaces de percibir la glucosa y transducir la señal de la abundancia de glucosa, es decir, son proteínas *moonlighting*.

#### 3.2.4.5.1. Proteinas Moonlighting

Pese a que la mayoría de las proteínas solo son capaces de realizar una única función, hay algunas que son multifuncionales, entre ellas se encuentra una subclase denominada proteínas *moonlighting* [Mani *et al.*, 2014; Rad *et. al.*, 2018]. Las proteínas *moonlighting* fueron descritas por primera vez en 1980 por Piatigorsky y Wistow y son aquellas proteínas que tienen funciones no relacionadas y autónomas, es decir, la inactivación de una función, no afecta a la otra [Huberts & van der Klei, 2010]. Estas proteínas se encuentran tanto en plantas [Moore *et al.*, 2003], como en animales (incluyendo al humano) [Sriram, 2005], levaduras [Gancedo & Flores, 2008] y bacterias [Arnér & Holmgren, 2000]. Algunos ejemplos de proteínas multifunción se enumeran en la tabla 2.

Las funciones de las proteínas *moonlighting* generalmente no están relacionadas; pueden ser dos funciones enzimáticas diferentes, o pueden combinar una función catalítica con una no catalítica, e incluso pueden ser dos funciones no catalíticas [Rad *et al.*, 2018]. Adicionalmente, estas funciones pueden variar como consecuencia de cambios en la localización celular, el tipo de células, concentración de ligando, sustrato, cofactor o producto [Jeffery, 1999] e incluso como respuesta a factores ambientales [Copley, 2014].

**Tabla 2 |** Ejemplos de función y organismo en los cuales se encuentran proteínas *moonlighting*. (\*) Denota la función principal (º) Denota la función *moonlighting*. Tomado y modificado de Huberts, 2010

Proteína	Organismo	Funciones		
Animales				
Aconitasa	Homo sapiens	Enzima del Ciclo de Krebs* Homeostasis del Hierroº		
ATF2	Homo sapiens	Factor de transcripción* Respuesta a daño del DNAº		
Cristalinas	Varios	Proteína estructural del cristalino* LDHº, α-enolasaº		
Citocromo C	Varios	Transportador de electrones* Apoptosisº		
Complejo ESCRT-II	Drosophila melanogaster	Proteína endosomal de clasificación* Localización del mRNA bicoideº		
ERK2	Homo sapiens	MAP cinasa* Represor transcripcional <sup>o</sup>		
STAT3	Mus musculus	Factor de transcripción* Cadena transportadora de electronesº		
	Plantas			
Hexocinasa	Arabidopsis thaliana	Metabolismo de la glucosa* Señalización por glucosaº		
Presenilina	Psycomitrella patens	γ-secretasa* Función citoesqueléticaº		
	Levaduras			
Aconitasa	Saccharomyces cerevisiae	Enzima del Cliclo de Krebs* Estabilidad del mtDNAº		
Aldolasa	Saccharomyces cerevisiae	Enzima glicolítica* Ensamblaje de la ATPasa Vº		
Enolasa	Saccharomyces cerevisiae	Enzima glicolítica* Transporte mitocondrial del tRNAº		
Fosfofructocinasa	Pichia pastoris	Enzima glicolítica* Peroxisomas de autofagiaº		
Galactocinasa	Kluyveromyces lactis	Catabolismo de la galactosa* Inductor de genesº		
Piruvato carboxilasa	Hansenula polymorpha	Enzima anaplerótica* Ensamblaje de la alcohol oxidasaº		
	Bacterias			
Enolasa	Streptococcus pneumoniae	Enzima glucolítica* Unión a plasminógenoº		

GroEL	Enterobacter aerogenes	Chaperona* Toxina para insectosº
Murl	Mycobacterium tuberculosis	Glutamato racemasa* Inhibidor de la DNA girasaº
Tioredoxina	Escherichia coli	Enzima contra el estrés oxidante* Subunidad de la DNA polimerasa T7º

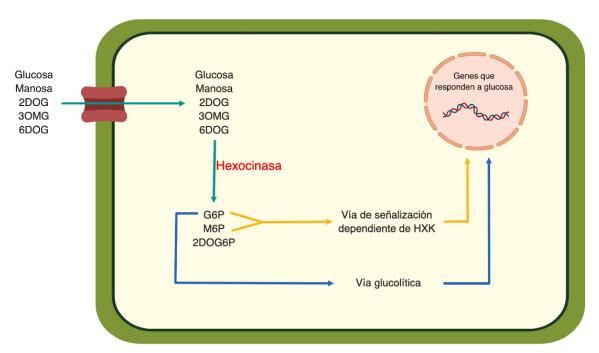
#### 3.2.4.5.2. Funciones *Moonlighting* de la hexocinasa

Ya que tanto la glucosa como otras hexosas son fosforiladas por la HXK y sus productos alimentan diferentes vías metabólicas, surge la pregunta ¿Cómo saber si los efectos en la expresión de genes y en la fisiología de las plantas por estos carbohidratos son causados por su sola presencia, su fosforilación o su metabolismo? Para contestarla se han realizado estudios de tipo farmacológico utilizando análogos no metabolizables de los diferentes carbohidratos. Para determinar el efecto señalizador de la glucosa se han usado manosa (Man), 2-deoxiglucosa (2DOG), 3-O-metilglucosa (3OMG) y la 6-deoxiglucosa (6DOG) (Figura 8).

Cada uno de los análogos de la glucosa, son capaces de ser transportados a través de la membrana hacia el interior de la célula [Xiao et al., 2000]; de los cuatro análogos, 6DOG y 3OMG no pueden ser fosforilados por la HXK y, aunque la manosa y 2DOG pueden ser fosforilados, no son metabolizados posteriormente [Sheen, 1990; Graham et al., 1994; Jang & Sheen, 1994]. La presencia de 6DOG y 3OMG dentro de la célula no desencadena ningún cambio en la expresión de genes [Villadsen & Smith, 2004], pero sí ocurre con manosa y 2DOG, y el hecho de que estas moléculas no pueden ser metabolizadas, pero sí fosforiladas, sentó las bases para profundizar en el estudio de la HXK como sensor de glucosa, y en cómo se transduce en un cambio en la expresión de genes.

La otra aproximación, aparte de la farmacológica, fue la genética. La obtención de mutantes de *A. thaliana* con diferentes sensibilidades a la suplementación del medio con glucosa, ha permitido el estudio de la señalización por azúcares. Las plantas silvestres de *A. thaliana* al ser crecidas en glucosa, reducen su desarrollo, mientras que plantas mutantes en el gen de la HXK1 son plantas insensibles a glucosa, denominadas gin

(glucose insensitive). La mutante gin 2-1 tiene una mutación sin sentido en la HXK (Q432\*) y la mutante gin 2-2 tiene una mutación de cambio de sentido en la HXK (G416A), por lo que ambas plantas carecen de actividad de la HXK1 [Moore et al., 2003].



**Fig. 8 Papel de la glucosa y sus análogos no metabolizables |** Solo aquellos análogos de glucosa que son fosforilables llevan a cambios en la expresión de genes, por lo que la señalización depende de su reconocimiento por la hexocinasa. Hay metabolitos intermediarios de la vía glucolítica que pueden afectar la expresión de genes en la planta, pero lo hacen a través de una vía independiente de la HXK. Tomado de Aguilera-Alvarado, 2017.

El fenotipo de las plantas gin 2-1 crecidas en cámara ambiental en condiciones de luz alta es notablemente diferente al de las plantas silvestres; las mutantes gin 2-1 muestran, hojas pequeñas de color verde oscuro que en etapa de floración su sistema de raíces, hojas, inflorescencias y peciolos son más pequeños, además de que la cantidad de silicuas y semillas es menor (Figura 9A). Solo el número de hojas y la cantidad de tricomas se mantuvo sin cambio. La actividad de fosforilación de glucosa de los extractos de las plantas gin 2-1 es solo del 50 %, actividad que se debe a sus otras dos HXKs catalíticas.

El fenotipo observado en las plantas gin 2-1 no es atribuible a los efectos de la glucosa en el crecimiento, ya que al crecer plantas silvestres y gin 2-1 en un medio con nitrato (antagonista de los efectos de la glucosa) y glucosa no hay cambios en el fenotipo.

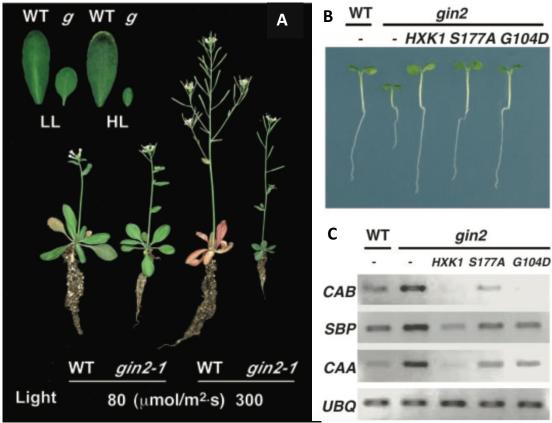


Fig. 9. Fenotipo de plantas silvestres (WT), gin 2-1, gin 2 1 complementada con HXK1 silvestre y con HXK mutadas en aminoácidos catalíticos | En el panel A se observan los fenotipos de las plantas silvestre (WT) y gin2-1 crecidas bajo dos diferentes condiciones de luz, es claro que las plantas gin 2-1 en alta intensidad luminosa son defectuosas en su desarrollo. En el panel B se muestra el desarrollo de las cinco plantas cuando crecieron en agar al 1%. En el panel C se muestra la expresión de genes fotosintéticos de las cinco plantas cuando crecieron en agar al 1 % suplementado con glucosa al 2 %. CAA Anhidrasa carbónica, CAB proteína de unión a clorofila y SBP sedoheptulosa bifosfatasa. Tomado de Moore et al., 2003.

Otra explicación a los efectos en el fenotipo de las plantas es que el metabolismo de la glucosa estaba reducido, para determinar si esto ocasionaba los cambios, el grupo de la doctora Sheen produjo por mutagénesis dirigida dos mutantes de HXK: una sin sitio de unión a ATP (G104D) y otra que evita la transferencia del grupo fosforilo a la glucosa (S177A). Las plantas gin 2-1 complementadas con la HXK1 silvestre y con las HXK G104D y HXK S117A, recuperaron la sensibilidad a la glucosa, así como la acumulación de clorofila de manera similar a la planta silvestre (Figura 9B), además presentaron represión de los genes fotosintéticos CAA, CAB2 y SBP (Figura 9C), sugiriendo que el metabolismo de la glucosa no es el responsable de los fenotipos característicos de la mutante y que AtHXK1

es una proteína *moonlighting*, ya que percibe la abundancia de la glucosa y lleva a cambios en la expresión de los genes fotosintéticos [Moore *et al.*, 2003].

La estrategia seguida por Moore y colaboradores (2003) ha sido utilizada posteriormente para demostrar la existencia de HXKs señalizadoras en *O. sativa, Nicotiana tabacum,* entre otras. El grupo del Dr. Jeon (Universidad de Kyung Hee, Corea del Sur) comprobó que las hexocinasas 5 y 6 de arroz son capaces de actuar como sensores de glucosa [Cho *et al.*, 2009], y que NtHXK1 tiene capacidad sensora [Kim *et al.*, 2013], ambos utilizando plantas de *A. thaliana*, la mutante gin 2-1 y mutantes gin 2-1 complementadas con las tres HXKs mencionadas.

Interesantemente, la mayoría de las HXKs sensoras son mitocondriales con excepción de OsHXK7, proteína citosólica [Kim *et al.*, 2016]. Se desconoce por qué estás HXKs tienen la capacidad de ser sensoras, pero se sugiere que por encontrarse en un lugar estratégico para la producción de ATP e incluso los cambios en el estado redox de la célula, la percepción de la abundancia de glucosa podría ser fácilmente traducida desde la mitocondria hacia cualquier otro compartimento celular.

#### 4. Justificación

En maíz se han caracterizado a seis hexocinasas, todas ellas catalíticas y que se encuentran en diferentes compartimentos subcelulares; dos citosólicas: ZmHXK7 y ZmHXK8, y cuatro mitocondriales: ZmHXK4-6 y ZmHXK9 [Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019] con ZmXHK6 como proteína que puede encontrarse en el núcleo [Hernández-Loyola, 2019]. La producción de mutantes en cada una de estas HXKs podría contribuir en el entendimiento de su participación fisiológica en la planta.

Las mutantes por complementación de las plantas gin 2-1 serían útiles para dilucidar cuál o cuáles de las HXKs de maíz son sensoras. El contar con plantas sobreexpresoras en cada ZmHXK podría ser útil para determinar si las HXKs ayudan a incrementar el flujo metabólico de carbono y así mejorar crecimiento de la planta. Mientras que las mutantes por remoción o silenciamiento de la HXKs, serían valiosas para evaluar el papel fisiológico de las HXKs.

Como primer acercamiento para avanzar en el conocimiento de las HXKs de maíz se complementaron a las mutantes gin 2-1 con cada una de las ZmHXKs. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar si alguna HXK de maíz es sensora, y se realizó la caracterización fenotípica y genotípica de las plantas complementadas con las HXKs mitocondriales: ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9.

#### 5. Hipótesis

Las plantas gin 2-1 complementadas con ZmHXKs mitocondriales regresarán al fenotipo silvestre de sensibilidad a glucosa, debido a que son proteínas sensoras de glucosa.

#### 6. Objetivos

#### 6.1. Objetivo general

Identificar a las ZmHXKs sensoras de la abundancia de glucosa.

#### 6.2. Objetivos particulares

- Corroborar que las plantas gin 2-1 fueron complementadas con ZmHXKs.
  - Corroborar mediante PCR la presencia de ZmHXKs en las plantas complementadas.
  - Verificar mediante inmunoréplica tipo Western Blot la presencia de ZmHXKs en las plantas complementadas.
  - Comprobar la ausencia de AtHXK1 en las plantas complementadas.
- Identificar a la ZmHXK sensora de la abundancia de glucosa.
  - Determinar el fenotipo de las plantas complementadas con ZmHXKs en medio suplementado con glucosa.
  - Determinar el efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes fotosintéticos en las plantas complementadas.

#### 7. Diseño experimental

Para cumplir los objetivos del trabajo se siguió el diseño experimental presentado en la figura 10. Esencialmente el protocolo se dividió en dos partes: *A.* Corroborar que las plantas carecen de AtHXK1 y que expresan a las HXKs de maíz y *B.* La identificación de la ZmHXK sensora.

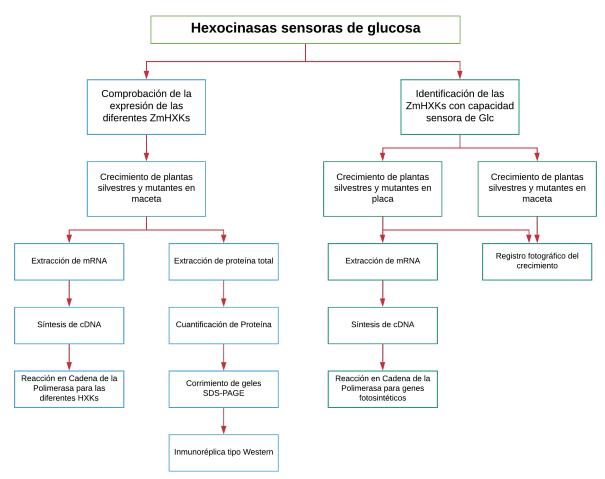


Fig. 10 Diagrama de flujo del diseño experimental de este trabajo | El diagrama experimental abarca dos grandes secciones en la primera la metodología realizada para corroborar que las plantas expresan a las diferentes HXKs de maíz y en la segunda se muestra la metodología realizada para identificar a la(s) HXK(s) sensora(s) de glucosa.

#### 8. Materiales y Métodos

#### 8.1. Material Vegetal

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Landsberg y cinco mutantes diferentes: la mutante gin 2-1 [Moore *et al.*, 2003] y las mutantes gin 2-1 complementadas

con alguna de las HXKs producidas previamente en el grupo de trabajo por Aguilera-Alvarado: ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9.

Desinfección de semillas.- En condiciones asépticas se transfirió a un microtubo estéril de 1.5 mL la cantidad de semillas necesarias para alcanzar la marca de 100 μL del tubo, se le agregó 1 mL de hipoclorito de sodio al 20 % v/v y 1 μL de Tween 20 al 0.1 % v/v y se agitaron mecánicamente durante 30 min y posteriormente se centrifugaron durante 10 s en una minifuga. Se retiró el líquido, se agregó 1 mL de agua estéril, se agitó mecánicamente durante 5 min y se centrifugaron. Este proceso de lavado se repitió cuatro veces más y finalmente las semillas se resuspendieron en 1 mL de agua estéril y se almacenaron a 4 °C y protegidas de la luz hasta su uso.

Crecimiento en maceta.- Para el crecimiento en maceta, estas se crecieron en dos condiciones de luz distintas: fotoperiodo largo y fotoperiodo corto. Para ambas condiciones el sustrato era una mezcla de tres partes de tierra Sunshine (Sunshine, Sun Gro Horticulture, Canada Ltd), una parte de Vermiculita (Sunshine, Sun Gro Horticulture, Canada Ltd) y una parte de Agrolita (Dicalite de México S. A. de C. V., Tlalnepantla, Estado de México).

Para las condiciones de fotoperiodo corto se sembraron tres lotes de 15 semillas de cada uno de los seis diferentes genotipos durante cuatro semanas bajo un fotoperiodo de 8 h luz/16 h oscuridad, a 22 °C y fueron regadas con agua de grifo cada 3 días o cuando se percibieran que el sustrato estaba seco. Después de las cuatro semanas, las plántulas se transfirieron a macetas individuales cambiando las condiciones a fotoperiodo natural en invernadero y alternando el riego con agua y solución Hoagland (Anexo I).

Para las condiciones de fotoperiodo largo, se sembró un lote de 15 semillas de cada uno de los seis diferentes genotipos durante 23 días bajo un fotoperiodo de 18 h luz/6 h oscuridad, a 22 °C y fueron regadas con agua de grifo según se mencionó anteriormente.

Crecimiento en caja.- Para determinar la longitud radicular de las seis líneas, se sembraron semillas previamente desinfectadas en cajas cuadradas con agar al 1 %, medio MS o medio Gamborg sin ningún otro componente añadido o con glucosa o manitol al 2

%. Las cajas con semillas se colocaron durante tres días a 4 °C, protegidas de la luz. Después de este periodo, las cajas se colocaron en un estante de manera vertical y se dejaron crecer en una cámara ambiental durante 14 días, en un fotoperiodo de 8 h luz y 16 h (fotoperiodo corto) en oscuridad a una temperatura de 22 °C.

Para determinar la expresión de genes fotosintéticos de las seis líneas, estas se hicieron crecer en cajas circulares con medio MS 0.5x y con glucosa o manitol al 6 %, el proceso de desinfección y mantenimiento a 4 °C se realizó como se describió anteriormente y se dejaron crecer las plantas durante 20 días bajo condiciones de luz continua y a 22 °C.

#### 8.2. Obtención, cuantificación y comprobación de la integridad del RNA

Las plántulas completas fueron congeladas con N2 líquido y se pulverizó en un mortero estéril, frío y previamente lavado con Cloralex®, se agregó 1 mL de Trizol (Thermo Fisher Scientific) al tejido pulverizado en el mortero, y una vez descongelada la muestra se colocó en un tubo de microfuga de 1.5 mL estéril. El tubo se centrifugó durante 15 min y 4 °C a 13000 rpm y el sobrenadante se transfirió a otro tubo de microfuga, después se le agregaron 200 μL de una mezcla Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó manualmente por 15 s. El tubo se volvió a centrifugar a 13000 rpm y 4 °C, esta vez durante 10 min. El sobrenadante se colocó en otro tubo de microfuga, se le agregaron 400 µL de cloroformo y se agitó manualmente por 15 s, el lavado con cloroformo y la centrifugación se repitieron y el sobrenadante se pasó a otro tubo de microfuga para agregarle 200 µL de isopropanol, el tubo se agitó en vórtex durante 15 s y se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 min, después se centrifugó durante 10 min a 4 °C y 13000 rpm. El sobrenadante se desechó evitando tirar el botón formado y este se lavó agregándole 1 mL de etanol al 70% y volviéndolo a resuspender para volver a centrifugarlo y tirar el sobrenadante. Finalmente, el botón se dejó secar y una vez seco, se resuspendió en 20 μL de agua libre de RNasas (Anexo IV).

Se determinó la cantidad de RNA de cada muestra en un NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) mediante absorbancia a 260 nanómetros. Para la evaluación de la integridad del RNA, se mezcló el volumen necesario para obtener 1.5  $\mu$ g de RNA, 5  $\mu$ L de amortiguador de carga 6x (Thermo Scientific) y el volumen necesario de agua libre de nucleasas para un volumen final de 30  $\mu$ L. Las muestras se resolvieron en un gel de agarosa al 2 % (Anexo IV) a 80 V por 45 min. Se usó amortiguador de corrida TAE 1x (Anexo IV). La integridad de las bandas de las subunidades ribosomales 18S y 28S se evaluó con la ayuda de un transiluminador ChemiDoc System, BioRad.

#### 8.3. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se empleó la transcriptasa reversa (RT). Se utilizó el volumen necesario para tener 4  $\mu g$  de RNA, este se mezcló con 4  $\mu L$  de Oligo dT 20  $\mu M$  (SIGMA) y el volumen necesario de agua libre de nucleasas para obtener un volumen final de 40  $\mu L$ . Se incubó a 70°C por 5 min y después 5 min en hielo.

A la mezcla anterior se le agregaron 40  $\mu$ L de la siguiente mezcla de reacción: 16  $\mu$ L de amortiguador ImProm 5x (Promega), 9.6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 4  $\mu$ L de dNTPs (10 mM), 4  $\mu$ L de RT (Promega) y el volumen necesario de agua libre de nucleasas para un volumen final de 40  $\mu$ L. Las condiciones que se utilizaron para la retrotranscripción fueron las siguientes:

Tabla 3 | Condiciones para la síntesis de cDNA

Ciclos	Temperatura	Duración
1	25 °C	5 min
1	42 °C	60 min
1	70 °C	15 min
1	4 °C	<b>∞</b>

# 8.4. Determinación de la expresión de las HXKs y genes fotosintéticos mediante PCR de punto final

Una vez sintetizado el cDNA, se realizó un PCR para determinar la expresión de *AtHXK1, ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6* y *ZmHXK9* y de los genes fotosintéticos *CAA, CAB* y *SBP*, utilizando ubiquitina (*UBQ*) como gen endógeno. Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando los recursos en línea Primer3Plus (www.bioinformatics.nl/cgi-

vin/primer3plus/primer3plus.cgi) para obtener la secuencia de los oligonucleótidos sentido y antisentido y además se usó el programa OligoAnalyzer (www.idtdna.com/calc/analyzer) para comprobar la temperatura de alineamiento y que los oligonucleótidos no formaran estructuras secundarias. Las condiciones de amplificación se muestran en las tablas 4, 5 y 6.

**Tabla 4 | Oligonucleótidos utilizados para la Reacción en Cadena de la Polimerasa.** También se muestran algunas de sus características generales.

muestran algunas de sus características generales.				
Gen	Número de acceso en Ensembl Plants	Sentido	Secuencia	Tamaño de amplicón
AtHXK1	A+4~20120 1	Sentido	5'-GGATGGTGGATTGTTTGAGC-3'	156 ph
ΑΙΠΛΚΙ	At4g29130.1	Antisentido	5'-GAGTGAGAAGCAGCAAGAAGC-3'	156 pb
CAA	A+E < 1 4740 C	Sentido	5'-GGTGGAAAACATTGTGGTGA-3'	200 nh
CAA	At5g14740.6	Antisentido	5'-CACATTCACTGCCTCCCTTT-3'	208 pb
CAB	At3g27690.2	Sentido	5'-GGTTCAAGGCAGGATCTCAA-3'	154 pb
CAB	AL3g27090.2	Antisentido	5'-AGAGGACCACCTCCGATTCT-3'	154 pb
SBP	At3g55800.1	Sentido	5'-GCACAAGCAACTCCTGACAA-3'	181 pb
JDF	At3g33600.1	Antisentido	5'-GCAAAGCCTCAAAGAGAAGC-3'	101 hn
UBQ	At5g20620.2	Sentido	5'-CAACCCTTCATTTGGTGCTT-3'	162 pb
UBQ	At3g20020.2	Antisentido	5'-GTCTCTGCTGATCTGGTGGA-3'	102 μυ
ZmHXK4	GRMZM2G058745 T02.1	Sentido	5'-GTGATCGAGGAGGTCGAGAG-3'	173 pb
ΔΙΙΙΠΛΝ4	GRIVIZIVIZG038743_102.1	Antisentido	5'-AACAGCCCATGTTCATCTCC-3'	1/3 pb
ZmHXK5	GRMZM2G432801 T01.1	Sentido	5'-GTGTGCTGCGAGTCCAACTA-3'	213 pb
ΖΙΙΙΠΛΚΟ	GRIVIZIVIZG432801_101.1	Antisentido	5'-GGAAGGAAAACGTGAAACCA-3'	213 pb
ZmHXK6	CDM7MEC9E66E2 TO1 1	Sentido	5'-CATTGCTGCTGAGTTGGAAA-3'	213 pb
ZIIIFIANO	nHXK6 GRMZM5G856653_T01.1		5'-CTTTCCATGGCCCTACTCAA-3'	213 bp
7m UVV0	CDM7M2C171272 TO2 1	Sentido	5'-TTCAGTTGCATCTGGCACTC-3'	172 nh
LIIIIXK9	mHXK9 GRMZM2G171373_T03.1		5'-CATATCTCCCAGCAGCCAAT-3'	173 pb

Tabla 5 | Condiciones utilizadas para la Reacción en Cadena de la Polimerasa para los genes CAA, CAB, SBP, UBQ, ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9

,,,,,				
Ciclos	Temperatura	Duración	Evento	
1	94 °C	3 min	Desnaturalización inicial	
35	98 °C	30 s	Desnaturalización	
	55 °C	1 min	Alineamiento	
	72 °C	1 min	Extensión	
1	72 °C	10 min	Extensión final	
1	4 °C	∞	-	

Tabla 6 | Condiciones utilizadas para la Reacción en Cadena de la Polimerasa para el gen AtHXK1

Ciclos	Temperatura	Duración	Evento
1	94 °C	3 min	Desnaturalización inicial
25	98 °C	30 s	Desnaturalización
	55 °C	1 min	Alineamiento
	72 °C	1 min	Extensión
1	72 °C	10 min	Extensión final
1	4 °C	$\infty$	-

Se comprobó la existencia del producto de amplificación para cada par de oligonucleótidos en un gel de agarosa al 2 % a 80 V por 45 min, utilizando el marcador de peso molecular de 100 pares de bases (PROMEGA) y el amortiguador de corrida TAE 1x. La integridad de las bandas se evaluó con la ayuda de un transiluminador ChemiDoc System, BioRad.

#### 8.5. Obtención y cuantificación de proteína total de tejido vegetal

Se pesó el tejido vegetal y con ayuda de un mortero y pistilo, utilizando nitrógeno líquido, éste se pulverizó hasta tener un polvo fino, el cual se transfirió a un tubo de microfuga de 1.5 mL hasta llegar a la primera marca, el tubo se llenó con ácido tricloroacético al 10 % (v/v) en acetona (Anexo V) y se agitó en vórtex por 15 s. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 12000 g y 4 °C durante 10 min y el sobrenadante se desechó. Los tubos se llenaron con acetato de amonio 0.1 M en metanol al 80 % v/v (Anexo V), se agitaron en vórtex por 15 s y se centrifugaron siguiendo las mismas condiciones anteriormente mencionadas, nuevamente el sobrenadante se descartó, los tubos se llenaron con acetona 80 % v/v (Anexo V), se agitaron con vórtex hasta que el botón se dispersó completamente y se volvieron a centrifugar. Después de la centrifugación, se descartó el sobrenadante, se dejó secar el botón al aire a temperatura ambiente y cuando estuvo seco, se llenaron los tubos con una mezcla 1:1 de fenol:amortiguador denso SDS (Anexo V), se agitaron en vórtex por 20 s y se dejaron incubar por 5 min para después centrifugarlos a 12000 g y 4 °C por 10 min. Posterior a la centrifugación, la fase superior se transfirió a otro tubo de microfuga, y cada uno de los tubos fue llenado con acetato de amonio 0.1 M en metanol al 80 % y se incubaron a -20 °C durante toda la noche, al día siguiente se centrifugaron a 12000 g y 4 °C durante 15 min y se descartó el sobrenadante. El botón se lavó una vez con metanol y una vez con acetona, resuspendiendo los botones y volviéndolos a centrifugar a 12000 g, 4 °C por 10 min. El botón lavado se dejó secar al aire, se resuspendió en amortiguador de fosfatos 100 mM pH= 8.0 y se cuantificó la cantidad de proteína en cada muestra.

La cuantificación de proteína se llevó a cabo utilizando el método de Bradford adaptado a microplacas de 96 pozos. La absorbancia producida por la reacción entre el reactivo de Bradford (BioRad) y la muestra se leyó a una longitud de onda de 595 nm.

## 8.6. Resolución de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS

Se hizo un gel de acrilamida al 12 % y 0.75 mm de grosor (Anexo VI) y se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard, Dual Color de BioRad. El gel se corrió a 60 V hasta pasar el gel concentrador y a 85 V a lo largo del gel separador. El gel se puso en contacto con la solución fijadora (Anexo VI), en agitación durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, la solución se decantó y se le agregó al gel solución teñidora (Anexo VI), se dejó reposando en agitación durante 2 h y posteriormente la solución teñidora se retiró y se agregó solución desteñidora hasta que el fondo fuera traslúcido o claro (Anexo VI). Se obtuvo un registro fotográfico del gel teñido con azul de Coomasie con el equipo ChemiDoc System, BioRad.

### 8.7. Inmunoréplica tipo Western

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida-SDS se transfirieron a una membrana PVDF de 0.45 µm (Immobilon-P Transfer Membranes, Merck Millipore) de la siguiente manera: El gel sin fijar ni teñir se sumergió en amortiguador de transferencia (Anexo VII) durante 30 min a temperatura ambiente y agitación constante. Posteriormente el gel se colocó en un casete de plástico que contenía en orden ascendente: una esponja, hoja de papel filtro, el gel, una hoja de membrana de PVDF, hoja de papel filtro y una esponja. Los elementos anteriormente mencionados se humedecieron con el amortiguador de transferencia y, además, antes de humedecer la

membrana, esta se dejó remojar con metanol por 5 min. El casete se colocó en la cámara de electrotransferencia de manera que éste quedara orientado hacia el cátodo y la membrana de PVDF hacia el ánodo, la electrotransferencia se realizó a 22 V durante 90 min. Después la membrana se lavó con agua, se le añadió 4 mL del primer reactivo del Sistema Western Blot Signal Enhancer (Pierce®) y se dejó actuar por 2 min, se realizaron cinco lavados consecutivos con agua, se añadieron 4 mL del segundo reactivo del Sistema Western Blot Signal Enhancer (Pierce®), se dejó actuar por 10 min y se lavó cinco veces con agua.

Para la inmunodetección, la membrana se colocó en 10 mL de solución bloqueadora (Anexo VII) durante 1 h y se mantuvo en agitación constante a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó tres veces durante 5 min con 10 mL de TTBS (Anexo VII). Una vez lavada la membrana, se le añadieron 2 mL de anticuerpo anti-V5 (monoclonal de ratón, Santa Cruz) a una dilución 1:2000 y se dejó interactuar durante toda la noche a 4 °C y agitación constante. Posteriormente, se lavó la membrana 3 veces con 10 mL de TBS durante 5 min cada lavado y 2 veces con 10 mL de TTBS durante 5 min, se agregó el segundo anticuerpo (IgG-AP anti-conejo producido en cabra DE Millipore) a una dilución 1:5000, se dejó interactuar por 4 h a temperatura ambiente bajo agitación constante y se realizaron lavados de TBS y TTBS como anteriormente se mencionó. La membrana se reveló mezclando 75 μL de NBT en dimetilformamida al 70 % con 75 μL de BCIP disuelto en dimetilformamida en 10 mL de solución PBS y se dejó interactuar hasta la aparición de bandas de suficiente intensidad.

### 8.8. Medición de la longitud radicular

A los 4, 5, 6, 7 y 14 días de crecimiento, se tomó registro fotográfico de las plantas crecidas en diferentes medios y con diferentes carbohidratos. Se utilizó el software de licencia libre, *ImageJ* (<a href="http://imagej.nih.gov/ij/?">http://imagej.nih.gov/ij/?</a>), desarrollado por el *National Institute of Health*. Se utilizó como longitud conocida la cuadrícula presente en cada caja Petri, en donde el largo de cada lado de los cuadrados pequeños es de 1.33 cm.

## 8.9. Generación de gráficos y análisis estadístico

Para la elaboración de las curvas de la longitud radicular y su respectivo análisis estadístico se utilizó el software Prism 8 (<a href="http://graphpad.com/scientific-software/prism/">http://graphpad.com/scientific-software/prism/</a>) desarrollado por GraphPad Software, Inc.

### 9. Resultados

### 9.1. Comprobación de la expresión de las diferentes ZmHXKs

# 9.1.1. Comprobación de la presencia de ZmHXKs en plantas complementadas mediante PCR

Para identificar si las plantas mutantes complementadas con ZmHXKs previamente producidas en el grupo de trabajo aún conservaban la mutación, se amplificó por PCR cada uno de los cuatro genes de las ZmHXKs (Figura11).

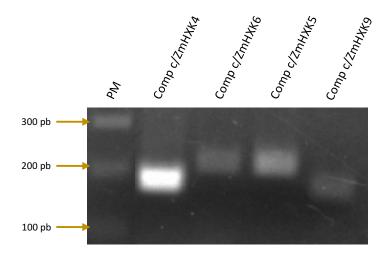


Fig. 11 Corrimiento electroforético del producto de PCR para cada una de las ZmHXKs presentes en las plantas gin 2-1 complementadas con las ZmHXKs | Se extrajo el RNA de plantas gin 2-1 complementadas con ZmHXK4, 5, 6 y 9, se obtuvo el cDNA de cada muestra y luego el cDNA fue sometido a la PCR para amplificar la ZmHXK específica. Se muestra el producto de la amplificación.

# 9.1.2. Comprobación de la presencia de ZmHXKs en plantas complementadas mediante Western Blot

Con la finalidad de demostrar la presencia de las ZmHXKs como proteína en las plantas complementadas, se extrajo la proteína total de cada una de las seis líneas de plantas conforme la metodología descrita en materiales y métodos, después de su

cuantificación, se procedió a elaborar un gel de poliacrilamida-SDS para separar a las proteínas. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membrana de PVDF y se detectó a las ZmHXKs utilizando un anticuerpo que reconoce la secuencia V5 que se adicionó a cada una de las proteínas. En la figura 12 se muestra que todas las plantas contenían ZmHXK recombinante.

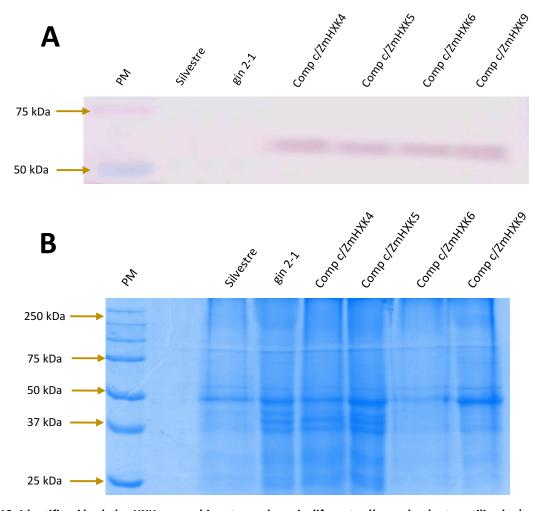


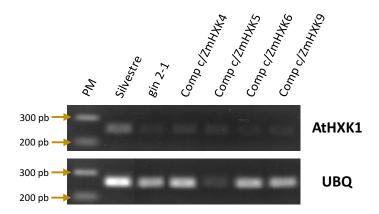
Fig. 12. Identificación de las HXKs recombinantes en las seis diferentes líneas de plantas utilizadas | A. Inmunoréplica tipo Western para detectar a la HXK recombinante con el epítope V5, el que se encuentra

unido por la región carboxilo terminal a cada una de la cuatro ZmHXKs. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular o PM; y en los siguientes se separaron los extractos proteicos de las plantas completas plantas silvestres; plantas complementadas con (Comp-c/) ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9. B. Gel de poliacrilamida-SDS que muestra la separación de las proteínas del extracto total de plantas silvestres y complementadas con ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomasie.

## 9.1.3. Comprobación de la ausencia de AtHXK1 en plantas complementadas

Las plantas silvestres de *A. thaliana* expresan a AtHXK1 completa, proteína de 496 aminoácidos, mientras que las mutantes gin 2-1 expresan una proteína 64 aminoácidos más corta, aunque se ha planteado que el mRNA que se produce de esta versión más corta del gen es menos estable [Maquat, 2002; Brogna & Wen, 2009; Rayson *et al.*, 2012; Shaul, 2015]. Las mutantes complementadas con ZmHXKs fueron diseñadas sobre un contexto genético gin 2-1.

Para corroborar que las plantas gin 2-1 con o sin complementar con las ZmHXKs expresaban a la AtHXK1 se realizó la reacción de PCR. En la figura 13 se muestra el producto de PCR para la AtHXK1 de cada una de las seis líneas utilizadas. Se observa que en todas las líneas hay expresión de la AtHXK1, aunque en mayor proporción en plantas silvestres. Lo que corrobora que cada una de las líneas de Arabidopsis son mutantes gin2-1 complementadas con ZmHXK.



**Fig. 13 Corrimiento electroforético del producto de PCR para AtHXK1** | En el panel A se observa el estándar de peso molecular (PM) y el producto de PCR para comprobar la ausencia de AtHXK1 en plantas silvestres (Wt), gin 2-1 y las plantas complementadas con cada una de las ZmHXKs. En el panel B se muestra el control para cada mutante la expresión de ubiquitina como gen endógeno.

### 9.2. Identificación de la ZmHXK sensora de la abundancia de glucosa

Con el fin de conocer el fenotipo de las cuatro plantas genéticamente modificadas y compararlas con las gin2-1 y las plantas silvestres, todas las líneas se hicieron crecer tanto en cajas Petri como en maceta. Además, era importante determinar cuál(es) de las

ZmHXKs mitocondriales era sensora de la abundancia de glucosa. Por lo que las semillas de *Arabidopsis* fueron crecidas en cajas con medios suplementados con glucosa al 2 % usando como lote control semillas que fueron sembradas en manitol al 2 % y en fotoperiodo de día corto, día largo y luz continua. En presencia de glucosa las plantas de *Arabidopsis* silvestres deben percibir su presencia y crecer pobremente, mientras que las *Arabidopsis* gin 2-1 en las que no se encuentra AtHXK1, HXK sensora, son insensibles a la presencia de glucosa por lo que se desarrollan más que las silvestres [Moore *et al.*, 2003].

# 9.2.1. Determinación del fenotipo de las plantas complementadas con ZmHXKs en medios suplementados con glucosa

Se sembraron semillas de las plantas modificadas genéticamente y de la planta silvestre en tres diferentes medios: A) uno sin sales, agar al 1%, B) en medio Gamborg (Anexo II), el cual contiene diferentes sales (incluyendo amonio y nitratos como fuente de nitrógeno) además de vitaminas, y C) un medio adicionado con sales, pero sin vitaminas, medio MS (Anexo III). Las semillas fueron crecidas en cada uno de los medios suplementados o no con glucosa al 2 % o manitol al 2 %. Las curvas del crecimiento radicular de las plantas en los diferentes tratamientos se muestran en la figura 14, mientras que el registro fotográfico se muestra en el Anexo VIII.

Las seis líneas de plantas que crecieron en agar sin carbohidrato a los 4 y 7 días presentan un crecimiento similar, aparecen las hojas cotiledonares y la raíz. La presencia de glucosa reduce el crecimiento aéreo sobre todo en las silvestres y gin 2-1 tanto a los 4 como a los 7 días de crecimiento, incluso algunas de las plantas presentan una coloración morada.

En cuanto al crecimiento radicular se observa que las plantas silvestres presentan raíces más largas que las plantas gin2-1 y que las complementadas (Fig. 14 y Tabla 7). Al añadir glucosa, como se esperaba las plantas silvestres reducen el crecimiento radicular, y las gin2-1 y las complementadas presentan un crecimiento mayor que las silvestres.

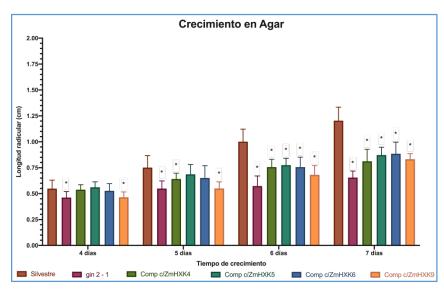
Tabla 7 | Efecto de diferentes medios en el crecimiento radicular de las plantas de Arabidopsis silvestres (wt), gin2-1 y complementadas con ZmHXKs (comp) crecidas por 7 días.

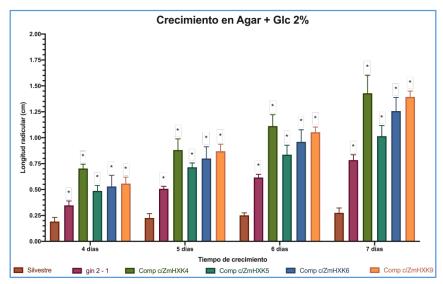
Medio	Agar			Gamborg			MS		
adicionado	wt	gin2-1	comp	wt	gin2-1	comp	wt	gin2-1	comp
-	++++	+++	+++	+++++	++	++++	+++	++	++
Glucosa	++	+++	+++++	+++	++++	+++++	++++	+++++	+++++
Manitol	++++	+++	++	++	+	++	++	+++	+++

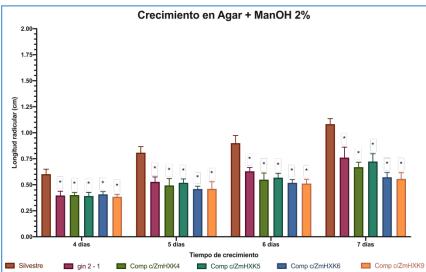
En el medio Gamborg la parte aérea es más abundante que en agar y en MS, aún más cuando se adiciona glucosa, pero no hubo plantas moradas. En cuanto a la zona radicular tanto las plantas silvestres como las complementadas crecen más en el medio Gamborg. Mientras que en medio Gamborg glucosa, las plantas silvestres presentan raíces pequeñas y las plantas complementadas crecen tanto o más que las gin2-1. El manitol se usa habitualmente como control de osmolaridad en estos ensayos, sin embargo, observamos que tiende a reducir el crecimiento de la planta si lo comparamos con el Gamborg solo.

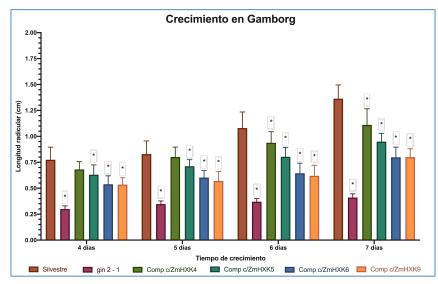
Las semillas germinadas en medio MS producen plantas más grandes que en agar debido, probablemente, a la presencia de nitrógeno, aunque la parte aérea de estas plantas son más pequeñas que las encontradas en medio Gamborg. Se observan raíces secundarias. Además, es claro que la adición de glucosa al medio MS lleva a la reducción del crecimiento de las plantas silvestres y las plantas gin2-1 y las complementadas crecen más.

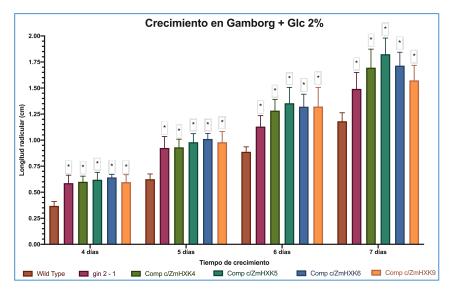
En conclusión, la parte aérea de las plantas no se observaron diferencias entre las Arabidopsis silvestres y las diferentes mutantes al crecer las plantas en un medio adicionado con glucosa comparado con agar, Gamborg y MS bajo un fotoperiodo de 8 h luz y 16 h oscuridad por 4 y 7 días a 22 °C. Sin embargo, es claro que cualquiera de los medios adicionado con glucosa produce una reducción del crecimiento de la raíz principal de las plantas silvestres y no en las gin2-1 y complementadas (Figura 14 y Tabla 7).

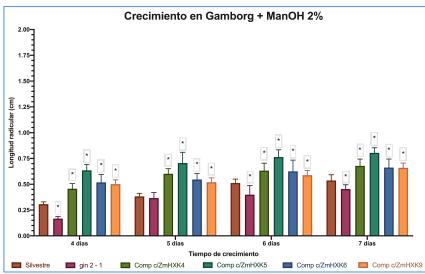


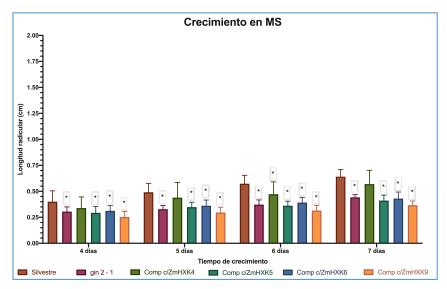


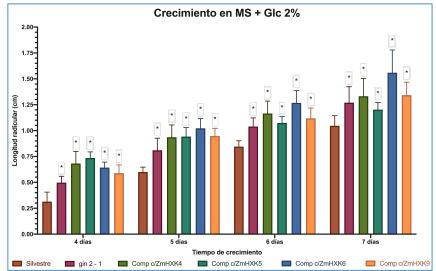












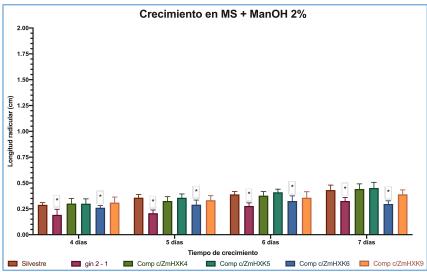


Fig. 14 Longitud radicular de las plántulas a diferentes tiempos y en tres diferentes medios Se utilizó la prueba t con un intervalo de confianza de p=0.05

## 9.2.2. Determinación del fenotipo de las plantas complementadas con ZmHXKs en maceta

Con el objetivo de registrar y describir el fenotipo de las plantas mutantes a tiempos prolongados de crecimiento, estas se crecieron en maceta bajo un fotoperiodo de 8 h luz/16 h oscuridad a 22 °C. En la figura 15 se muestran las plantas de las cuatro diferentes líneas que expresan a las ZmHXKs a los tres meses de edad, además de la planta silvestre y la mutante gin 2-1.



**Fig. 15 Fenotipo de las plantas silvestre y mutantes crecidas en maceta** | Se muestra el fenotipo de las seis líneas utilizadas a los tres meses de edad cuando fueron crecidas en cámara ambiental durante el primer mes, bajo condiciones de luz y temperatura controlada (8 h luz/16 h oscuridad, 22 °C) y los dos meses restantes en fotoperiodo natural a una temperatura de 22 °C. Se indica con flechas los peciolos.

El tamaño de las hojas y los peciolos es menor en todas las plantas genéticamente modificadas, incluyendo la mutante gin 2-1, comparadas con la planta silvestre (Figura 15). En un acercamiento a las hojas de cada una de las plantas, se observa que la cantidad

de tricomas (estructura tipo pelo) y el número de hojas no varía respecto a la planta silvestre, como se observa en la figura 16.



**Fig. 16 Fenotipo de las plantas silvestre y mutantes crecidas en maceta** | Se muestra un acercamiento de las hojas de cada una de las diferentes líneas de plantas utilizadas y mostradas en la figura 15, en donde se puede observar la cantidad de tricomas. **A** – planta silvestre, **B** – planta gin 2-1, **C** – planta gin 2-1 complementada con ZmHXK4, **D** – planta gin 2-1 complementada con ZmHXK5, **E** – planta gin 2-1 complementada con ZmHXK9.

# 9.2.3. Fenotipo de plantas gin 2-1 complementadas con ZmHXKs en condiciones de día largo

De acuerdo con Cho y colaboradores (2009) y Kim y colaboradores (2013), el fenotipo de las plantas gin 2-1 complementadas con hexocinasas exógenas es más notorio cuando estas se hacen crecer en condiciones de día largo, es decir 18 h luz y 6 h oscuridad, por lo que se decidió sembrar semillas bajo dichas condiciones. En la Figura 17 se muestran los fenotipos de las seis diferentes líneas de plantas.













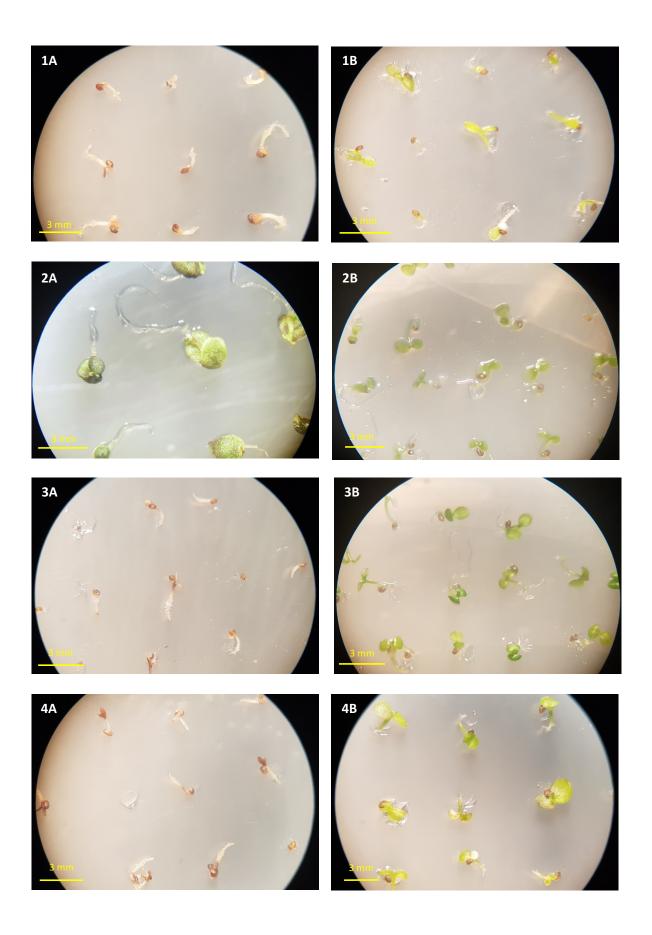
Fig. 17 Fenotipo de las plantas silvestres y mutantes crecidas en macetas en condiciones de luz prolongada | Se muestra el fenotipo de las seis líneas utilizadas a los 23 días de edad, crecidas en cámara ambiental bajo condiciones de luz y temperatura controladas (18 h luz/6 h oscuridad y 22 °C).

Las plantas silvestres son de mayor tamaño que las otras plantas, también el número, tamaño de hojas y el largo de los peciolos es mayor. Pero a pesar del tamaño menor de hojas, se encontró que algunas de las plantas mutantes complementadas con ZmHXK5 y todas las plantas complementadas con ZmHXK6 presentaban inflorescencias, así como también presentaban hojas caulinas (hojas a lo largo del tallo), lo cual no ocurre en las plantas silvestres. Adicionalmente, algunas de las hojas de la mutante complementada con ZmHXK5 son de color café y el color de las todas hojas de la mutante complementada con ZmHXK9 es de un verde más oscuro que las de las otras plantas.

# 9.2.4. Determinación del efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes fotosintéticos en las plantas complementadas

El laboratorio del Dr. Jeon [Cho *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013], indica que el efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes fotosintéticos se puede apreciar cuando plantas mutantes gin 2-1 complementadas con HXKs heterólogas crecen en condiciones ininterrumpidas de luz y concentración alta de glucosa (6 %). Los resultados de crecimiento de las plantas de los diferentes genotipos en dichas condiciones por 23 días se muestran en la figura 18.

Las plantas de *A. thaliana* silvestres crecidas en glucosa muestran un fenotipo de crecimiento retrasado y sin desarrollo de los cotiledones, fenotipo denominado de sensibilidad a glucosa. Las plantas gin 2-1 en glucosa muestran una raíz más larga y hojas cotiledonares grandes y de color verde. Mientras que las plantas gin 2-1 complementadas con las ZmHXK4, 5, 6 y 9 presentan un fenotipo similar a las plantas silvestres, lo que sugiere que están percibiendo la abundancia de glucosa ya que son HXKs sensoras.



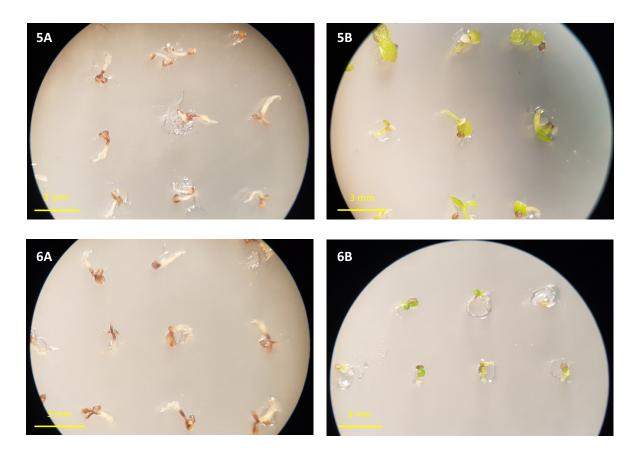


Fig. 18 Fenotipo de las plantas silvestre y mutantes crecidas en placa en condiciones de luz continua | Se muestra el fenotipo de las seis líneas utilizadas a los 23 días de edad, crecidas en cámara ambiental bajo luz continua y a 22 °C. Todas las cajas contenían medio MS al 0.5x, la serie A tiene glucosa al 6% y la serie B tiene manitol al 6%. Los números indican la línea de planta: 1 – Silvestre, 2 – gin 2-1, 3 – gin 2-1 complementada con ZmHXK4, 4 – gin 2-1 complementada con ZmHXK5, 5 – gin 2-1 complementada con ZmHXK6 y 6 – gin 2-1 complementada con ZmHXK9.

Para corroborar que efectivamente las ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9 son sensoras se procedió a comprobar la expresión de los genes fotosintéticos *CAA*, *CAB* y *SBP* mediante PCR utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA de las plantas mostradas en la figura 18. Los productos de amplificación se muestran en la figura 19. Como se observa cuando las plantas crecidas en manitol presentan una mayor expresión de los genes fotosintéticos (Figura 19A) que aquellas plantas que crecieron en presencia de glucosa (Figura 19B).

Por lo tanto, los fenotipos de las plantas y la represión de genes fotosintéticos indican que ZmHXK4 ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9 son proteínas sensoras de la abundancia de glucosa.

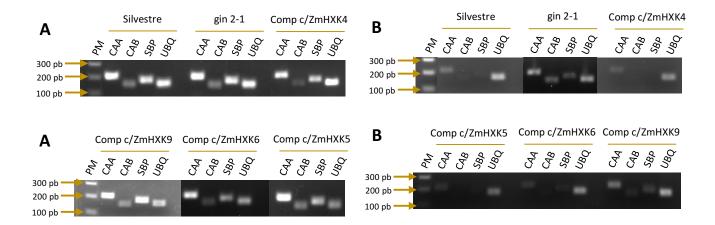


Fig. 21 Corrimiento electroforético de los productos de PCR para los genes fotosintéticos analizados | A corrimiento electroforético de los productos de PCR para los genes fotosintéticos utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de plántulas crecidas en Medio MS al 0.5x y manitol al 6 %. B muestra el corrimiento electroforético de los productos de PCR para los genes fotosintéticos utilizando cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de plántulas crecidas en Medio MS al 0.5x y glucosa al 6 %.

### 10. Discusión

## 10.1. Confirmación de la complementación de plantas gin 2-1 con ZmHXKs

Pocos estudios se han realizado sobre la caracterización de las HXKs en plantas de interés agronómico, nuestro grupo ha contribuido con la caracterización bioquímica de las HXKs en maíz. La capacidad catalítica de seis HXKs de maíz fue demostrada y se obtuvieron sus valores de K<sub>m</sub> para glucosa, fructosa, manosa y ATP, pudiéndolas separar en tres grupos: uno con una actividad marginal, con un solo miembro: ZmHXK9, un segundo grupo con enzimas con alta afinidad por los azúcares formado por ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK7 y el último con un miembro con muy baja afinidad por todos los sustratos probados, pero más aún por fructosa ZmHXK8. En cuanto a localización, se encontró que ZmHXK7 y ZmHXK8 son HXKs citosólicas y las otras cuatro se localizan en la mitocondria [Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019]. Continuando con la caracterización de las HXKs también se exploró la posibilidad de que pudieran ser HXKs sensoras [Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019].

Para identificar a las HXKs sensoras, la estrategia experimental que se sigue es complementar a las mutantes gin 2-1 con la HXK de la que se tiene interés de conocer esa capacidad. Las mutantes gin 2-1, son plantas de *Arabidopsis* que presentan a una AtHXK1 con una mutación sin sentido, Q432\*, ese tipo de mutaciones pueden llevar a menores niveles de expresión del gen en cuestión debido a inestabilidad del mRNA, en un proceso llamado decaimiento del mRNA [Maquat, 2002; Brogna & Wen, 2009; Rayson *et al.*, 2012; Shaul, 2015]. Se corroboró en este trabajo que en las plantas gin 2-1 hubo una nula o baja expresión de AtHXK1, una HXK sensora de Arabidopsis. Se conoce que la ausencia de AtHXK1 reduce la sensibilidad a la glucosa, por lo que las plantas de *Arabidopsis* silvestres normalmente responden retrasando su crecimiento al crecerlas en glucosa, mientras que las plantas gin 2-1 continúan su crecimiento, además estas últimas son incapaces de reprimir la expresión de algunos genes fotosintéticos [Moore *et al.*, 2003].

Aguilera-Alvarado (2019) obtuvo las semillas gin 2-1 complementadas con ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9 y realizó un análisis exploratorio para identificar a las HXKs sensoras.

En este trabajo fueron varias las razones para buscar la capacidad sensora en las HXKs mitocondriales de maíz: a) la mayoría de las HXKs sensoras en plantas se encuentran en ese compartimento celular (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017); b) el análisis *in silico* de ZmHXK4, ZmHXK5 y ZmHXK6 sugiere la presencia de una señal de localización nuclear o NLS, misma que se encuentra adyacente a la señal de anclaje a la mitocondria o mTP (Hernández-Loyola, 2019), sugerente de que podría formar parte del complejo represor que se encarga de regular algunos genes fotosintéticos; c) la mutante ZmHXK6Δ30 pierde la mTP y cambia su localización de la mitocondria al núcleo (Hernández-Loyola, 2019). Por lo que es posible que ZmHXK6 y las enzimas que son más similares a ella presenten capacidad sensora.

En la presente tesis se continuó la caracterización de las semillas producidas por Aguilera-Alvarado (2019), y para ello se tomaron las semillas de la generación T4 de las cuatro líneas de mutantes, se crecieron y se compararon con las plantas silvestres y las gin 2-1 sin complementar. Las plantas gin 2-1 complementadas con ZmHXKs presentaron

bajos niveles de AtHXK1, similar a las plantas gin 2-1, como era de esperarse puesto que ese era el fondo genético usado. Además, los transcritos de cada una de las líneas expresaba una ZmHXK, esto evaluado por PCR y también se encontró a la proteína recombinante, evaluado por inmunoréplica tipo Western. Por lo que se confirma que se tienen cuatro mutantes, plantas gin 2-1 complementadas con alguna de las cuatro HXKs: ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9. Aunque no se determinó si la capacidad de fosforilar hexosas aumentaba en estas plantas.

### 10.2. Fenotipo de las plantas gin 2-1 complementadas con ZmHXKs

Una manera de identificar la función fisiológica de una proteína es a través de la identificación de diferencias fenotípicas entre las mutantes que expresan a la proteína de interés. En este trabajo se usaron como controles a las plantas silvestres de A. thaliana, así como a las mutantes gin 2-1, así que se realizaron varios ensayos con semillas de todas las líneas y fueron germinadas en un fotoperiodo corto, en placas con agar, medio MS que es un medio que presenta entre otros iones al nitrato y el medio Gamborg que además de los iones del MS presenta tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y mioinositol. El fenotipo de la parte aérea de las plantas gin 2-1 y las gin 2-1 complementadas fue similar al de las silvestres cuando fueron crecidas en medios ricos de nitrógeno, aun cuando fueron suplementados con glucosa, esto se debe a que el ion NO<sub>3</sub>, es capaz de antagonizar los efectos de la glucosa [Stitt & Krapp, 1999; Moore et al., 2003]. Sin embargo, en agar sí se lograron observar algunas diferencias; la presencia de glucosa ocasiona que las hojas y los tallos de las plantas gin 2-1 y las complementadas presenten una coloración ligeramente púrpura. Adicionalmente, se logró observar que independiente del medio, las plantas silvestres presentan una raíz con crecimiento menor cuando el medio era adicionado con glucosa.

Por otra parte, el medio en el que mejor crecieron las plantas fue el Gamborg y esto es probablemente a que la piridoxina promueve el desarrollo de las raíces [Chen & Xiong, 2005; 2009] y a que también puede funcionar como un antioxidante [Bilski *et al.*, 2000; Denslow, *et al.*, 2005; Havaux *et al.*, 2009]. Mientras, que la presencia de tiamina

también puede llevar a promover el desarrollo radicular [Bonner, 1937; 1939; Bonner & Devirian, 1939].

Cuando se crecieron plantas en maceta utilizando un fotoperiodo largo se encontró que claramente, las mutantes gin 2-1 y gin 2-1 complementadas crecen menos o se desarrollan de manera diferente a las plantas silvestres. Las gin 2-1 no tienen desarrollo del escapo, mientras que las complementadas con ZmHXK6 presentan inflorescencias y hojas caulinas; además, las ZmHXK9 tiene hojas con una tonalidad verde más oscura que las demás.

La presencia de hojas púrpura podría deberse a una mayor síntesis de antocianinas, ya que la HXK está relacionada directamente con su síntesis; al menos en manzana se encontró que la fosforilación del factor de transcripción, MdbHLH3, induce positivamente la síntesis de antocianinas [Hu et al., 2016].

Las diferencias en crecimiento entre las plantas complementadas y las gin 2-1 podrían deberse a diferencias en los niveles de proteína expresada, sin embargo, es interesante que no se comportan de manera idéntica a las gin2-1, pero tampoco a las silvestres. También podría indicar que las ZmHXKs mitocondriales no son redundantes, no obstante, es necesario realizar más experimentos para determinar el papel fisiológico de cada una de las proteínas.

# 10.3. Fenotipo de insensibilidad a glucosa de las plantas gin 2-1 complementadas con las ZmHXKs mitocondriales.

La capacidad sensora de las HXKs se determina creciendo a las plantas gin2-1 complementadas con HXK en altas concentraciones de glucosa, generalmente 6 %, y bajo luz continua [Cho *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2013]. Además, como se mencionó anteriormente el fenotipo es diferente cuando se crece en agar, por lo que las plantas fueron crecidas en este medio. Encontramos que bajo esas condiciones tanto las plantas silvestres como las complementadas con las ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9 presentan un fenotipo de retraso en el desarrollo de los cotiledones, ausencia de coloración verde, pero presencia de color púrpura, que probablemente puede ser debido

a la acumulación de antocianinas en las hojas, contrario al fenotipo que se obtiene cuando las plantas son crecidas en manitol, lo que indica que el fenotipo no es debido a la osmolaridad de la alta concentración de glucosa, así el fenotipo de sensibilidad a glucosa podría sugerir que ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9 son sensoras.

Por otra parte, en diferentes plantas se ha demostrado que, al crecer en abundancia de glucosa, estas presentan un mayor contenido de antocianinas, mientras que otros carbohidratos no son capaces de llevar a cabo está inducción. La glucosa es capaz de inducir la transcripción de la enzima chalcona sintasa [Xiao et. al., 2000], la cual está involucrada en la biosíntesis de flavonoides, incluyendo las antocianinas [Teng et al., 2005; Jeong et. al., 2010]. La glucosa también puede ser transformada en UDP-Glucosa, molécula que puede ser utilizada para sintetizar compuestos fenólicos glicosilados que protegen a la planta de las especies reactivas de oxígeno producidas por el metabolismo y la luz [Bolouri-Moghaddam et al., 2010]. Las antocianinas son utilizadas por las plantas como apagadores de los efectos deletéreos de crecer en condiciones de luz abundante o prolongada [Hughes et al., 2005; Landry et al., 2005] y previenen del daño foto-oxidativo y foto-inhibitorio [Harvaux & Kloppstech, 2001].

En manzana se demostró que la acumulación de antocianinas se debe no solo al efecto metabólico de la HXK sino también a que estabiliza a un factor de transcripción que regula positivamente la síntesis de antocianinas [Hu et al., 2016].

En cuanto al tamaño menor de las hojas de todas las plantas gin 2-1 complementadas con ZmHXKs es sugerente de un defecto en la expansión de las células, algunas fitohormonas son capaces de promover la elongación celular, como las auxinas, giberelinas y brasinosteroides [Krouk et al., 2011; Ljung et al., 2015; Sakr et al., 2018], mientras que la citocinina es capaz de reducirla [Tanimoto, 2007; Depuydt & Hardtke, 2011] y se conoce que la vía de señalización de estas hormonas está relacionada con la de la glucosa [Gibson, 2003; León, 2003]. Experimentos en presencia de las hormonas mencionadas o bien la determinación del contenido de esas hormonas podrían ayudar a entender la relación de las HXKs con las hormonas.

### 10.4. Las HXKs mitocondriales son HXKs sensoras

Además de observar el fenotipo de sensibilidad a glucosa, se encontró que las plantas gin2-1 complementadas con las ZmHXKs mitocondriales son capaces de reprimir los genes fotosintéticos *CAA*, *CAB* y *SBP* cuando crecen en alta concentración de glucosa y luz continua. En Arabidopsis se demostró el mecanismo por el que *CAB2* es reprimido, lleva a que AtHXK1 forme un complejo con dos proteínas que no tienen relación con el metabolismo de carbono, VHA-B1 y RPT5B, el complejo se encuentra en el núcleo y allí interacciona con factores transcripcionales, estos interaccionan directamente río arriba de *CAB2* [Jeng *et al.*, 1992; Sheen, 1994; Moore *et al.*, 2003; Young-Hee *et al.*, 2006]. A pesar de que se ha encontrado el complejo en el núcleo se desconoce cómo llega allí, también se desconoce si hay otros genes que son regulados de la misma manera por la HXK.

A la fecha se han estudiado varias familias de HXKs, para algunos miembros se ha buscado y encontrado su función sensora con la estrategia seguida en este trabajo, entre ellas se encuentran: AtHXK1 y AtHKL3 en Arabidopsis, ambas HXKs de localización mitocondrial, la segunda carece de actividad catalítica y ambas están fuertemente relacionadas con la vía de señalización por citocininas [Moore et al., 2003; Cho et al., 2006]; OsHXK5, OsHXK6 Y OsHXK7 en arroz; las dos primeras se localizan en la mitocondria y la última en el citosol [Cho et al., 2009; Cheng et al., 2011; Kim et al., 2016]; NtHXK1 protege a la planta de los efectos deletéreos de las ROS [Sorowar et al., 2008]; MdHXK1 en manzana es sensor de la abundancia de azúcares y cinasa de proteínas [Hu et al., 2016; Sun et al., 2018]; la única HXK en Klebsormidium nitens, KnHXK1, solo es capaz de restaurar el fenotipo silvestre en Arabidopsis cuando la enzima presenta actividad catalítica [Ulfstedt et al., 2018].

Identificar a las HXKs con capacidad multifuncional en plantas es necesario para determinar los procesos fisiológicos en los cuales podrían participar. En el caso de las HXKs la función sensora es relevante para percibir los cambios en la abundancia de glucosa, proceso que sucede no solo en condiciones fisiológicas sino también en respuesta a los cambios ambientales. Por ejemplo, en manzana en condiciones de estrés salino hay un aumento en el contenido de glucosa que es percibido por MdHXK1, luego la enzima

fosforila al factor transcripcional MdbHLH3, que participa en la inducción de la vía de síntesis de antocianinas [Hu *et al.*, 2016]. Paralelamente, MdHXK1 fosforila al antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> vacuolar, favoreciendo la captación de sodio por la vacuola ante el estrés salino [Sun *et al.*, 2018]. La habilidad sensora de la HXK permite que la planta responda ante el estrés salino. Desconocemos si alguna de las HXKs mitocondriales de maíz tiene un papel similar o si puede ayudar a enfrentar otro tipo de estreses.

Por otra parte, resulta interesante que la mayoría de las HXKs sensoras se localicen en la membrana externa de la mitocondria. Se conoce varias proteínas localizadas en ese lugar, como AtTRZ3, AtLigl, AtAPL y AtPNMI, son capaces de movilizarse al núcleo ante situaciones de estrés por patógenos o ambiental y que al migrar se comportan como factores transcripcionales [Duchêne & Giegé, 2012]. Es posible que estás proteínas sean parte de la conexión entre diferentes vías metabólicas o un interruptor entre vías que permita que la célula responda rápidamente ante cambios en su ambiente. Una HXK sensora que se encuentre en la mitocondria y que se transloca al núcleo o que forma complejos fuera de la mitocondria, podría representar una ventaja en la percepción de los cambios metabólicos o ambientales pudiendo dirigirse al núcleo para modificar las respuestas de la planta. Sin embargo, para entender el papel de las HXKs mitocondriales en la planta es necesario someter a las plantas complementadas o bien a plantas sobreexpresoras a diferentes tipos de estrés ambiental o de tipo biótico para determinar su participación en las respuestas de la planta ante el estrés.

Sin embargo, ahora que se demostró que las cuatro HXKs mitocondriales de maíz son HXKs sensoras, es posible buscar en qué tipo de respuestas está cada una participando, lo anterior se puede realizar mediante estudios de interacción proteína-proteína, para descubrir posibles interactores de la enzima, y si estos son diferentes entre las diferentes HXKs. También se pueden realizar estudios estructurales para determinar si existen motivos o dominios que permitan sugerir algún tipo de actividad distinta de la proteína, o que explique por ejemplo como ZmHXK9 que tiene una actividad marginal fosforilante de hexosas, también sea una HXK sensora.

### 11. Conclusiones

- Las plantas transformadas previamente en el grupo de trabajo son plantas gin 2-1 complementadas con los genes de ZmHXKs y estás plantas son capaces de expresar a estas proteínas.
- ZmHXK4, 5, 6 y 9 son capaces de recuperar el fenotipo de sensibilidad a glucosa de manera similar al encontrado en las plantas silvestres de *Arabidopsis*.
- ZmHXK4, 5, 6 y 9 son HXKs sensoras de la abundancia de glucosa capaces de reprimir los genes fotosintéticos CAA, CAB y SBP.

## 12. Perspectivas

- Generar por mutagénesis dirigida mutantes no catalíticas de todas las plantas complementadas con ZmHXKs para determinar si estas también tienen la capacidad de sensar glucosa y reprimir los genes fotosintéticos.
- Determinar si ZmHXK4-6 y ZmHXK9 son capaces de interactuar con VHA-B1 y
   RPT5B, así como lo hace AtHXK1 para reprimir la expresión del gen CAB2.
- Producir mutantes de A. thaliana sobreexpresoras de las cuatro hexocinasas mitocondriales de maíz (ZmHXK4-6 y ZmHXK9) y/o mutantes de maíz por medio de CRISPR/Cas para entender el papel fisiológico de cada una de ellas.
- Analizar la función sensora de las HXKs citosólicas.
- Realizar estudios estructurales de cada una de las HXKs sensoras que permitan identificar diferencias que podrían llevar a explicar la actividad sensora y/o de interacción con diferentes proteínas.

#### 13. Referencias

Adami, A., García-Álvarez, B., Arias-Palomo, E., Barford, D., Llorca, O. 2007. *Structure of TOR and its complex with KOG1.* Molecular Cell. 27: 509-516.

Aguilera-Alvarado, G. P., Guevara-García, 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. 1-18.
- Aguilera-Alvarado, G. P., Sánchez-Nieto, S. 2017. *Plant Hexokinases are Multifaceted Proteins.* Plant Cell Physiology. 58(7): 1151-1160.
- 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: 1571-1583.
- Alderson, A., Sabelli, P. A., Dickinson, J. R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Shewry, P. R., Halford, N. G. 1991. *Complementation of snf1, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA*.

  Proceedings of the National Academy of Sciences. 88: 8602-8605.
- Aleshin, A. E., Zeng, C., Bartunik, H. D., Fromm, H. J., Honzatko, R. B. 1998. *Regulation of the hexokinase I: crystal structure of recombinant human brain hexokinase complexed with glucose and phosphate.* Journal of Molecular Biology. 282(2): 345-357.
- Arnér, E. S., Holmgren, A. 2000. *Physiological functions of thioredoxin and thioreduxin reductase. European Journal of Biochemistry.* 267: 6102-6109.
- Baena-González, E. 2010. *Energy signaling in the regulation of gene expression during stress.* Molecular Plant. 3: 300-313.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., Sheen, J. 2007. *A central integrator of transcription networks in plants stress and energy signaling.* Nature. 448: 938-942.
- Baena-González, E., Sheen, J. 2008. *Convergent energy and stress signaling.* Trends in Plant Science. 13: 474-482.
- Baretić, D., Williams, R., 2014. *The structural basis for mTOR function.* Seminars in Cell Developmental Biology 36: 91-101.
- Bateman, A. 1997. *The structure of a domain common to archeabacteria and the homocystinuria disease protein.* Trends in Biochemical Sciences. 22: 12-13.

- Beczner, F., Dancs, G., Sos-Hegedus, A., Antal, F., Banfalvi, Z. 2010. *Interaction between*\*\*SNF1-related kinases and a cytosolic pyruvate kinase of potato. Journal of Plant Physiology. 167: 1046-1051.
- Bilski, P., Li, M., Ehrenshaft, M., Daub, M., Chignell, C. 2000. *Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants.* Photochemistry & Photobiology. 71: 129-134.
- Bolouri-Moghaddam, M., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., Van den Ende, W. 2010. *Sugar* signalling and antioxidant network connections in plant cells. FEBS. 277: 2022-2037.
- Bonner, J. 1937. Vitamin B1 a growth factor for higher plants. Science. 85: 183-184.
- Bonner, J. 1938. *Thiamine (Vitamin B1) and the growth of roots:* The relation of chemical structure to physiological activity. American Journal of Botany. 25: 543-549.
- Bonner, J., Devirian. P. 1939. *Growth factor requirements of four species of isolated roots.* American Journal of Botany. 26: 661-665.
- Brogna, S., Wen, J. 2009. *Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms.* Nature Stuctural & Molecular Biology. 16(2): 107-113.
- Caldana, C., Li, Y., Leisse, A., Zhang, Y., Bartholomaeus, L., Fernie, A., Willmitzer, L., Giavalisco, P. 2013. *Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants* reveal a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana. Plant Journal. 7: 897 909
- Cárdenas, M.L., Cornish-Bowden, A., Ureta, T. 1998. *Evolution and regulatory role of the hexokinases*. Biochimica et Biophysica Acta. 1401: 242-264.
- Chen, H., Xiong, L. 2005. *Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stress.* Plant. 44: 396-408.
- Chen, H., Xiong, L. 2009. *The short-rooted vitamin B6-deficient mutant pdxI has impaired local auxin biosynthesis.* Planta. 229: 1303-1310.
- 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): 173-177.

- Cho, J. I., Ryoo, N., Eom, J. S., Lee, D. W., Kim, H. B., Jeong, S. W., Lee, Y. H., Kwon Y. K., Cho, M. H., Bhoo, S. H., Hahn, T. R., Park, Y. I., Hwang, I., Sheen, J., Jeon, J. S. 2009.

  \*Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as Glucose sensors.\* Plant Physiology. 149: 745-759.
- Cho, J. I., Ryoo, N., Ko, S., Lee, S. K., Lee, J., Jung, K. H., Lee, Y. H., Bhoo, S. H., Winderockx, 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, 598-611.
- Claeyssen, É., Rivoal J. 2007. *Isozymes of plant hexokinase: Ocurrence, properties and functions.* Phytochemistry. 68: 709-731.
- Contento, A. L., Kim, S. J., Bassham, D. C. 2004. *Transcriptome profiling of the response of Arabidopsis suspension culture cells to Suc starvation.* Plant Physiology. 135: 2330-2347.
- Copley, S. 2014. *An evolutionary perspective on protein moonlighting.* Biochemical Society Transactions. 42: 1684-1691.
- Coruzzi, G.M., Zhou, L. 2001. *Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants:*emerging 'matrix effects'. Current Opinion in Plant Biology. 4: 247-253.
- Dai, N., Kandel, M., Levine, I., Ricard, B., Rothan, C., Schaffer, A. A., Granot, D. 2002. *The tomato hexokinase LeHXK1 cloning, mapping, expression pattern and phylogenetic relationships.* Plant Science. 163: 581-590.
- Dale, S., Arró, M., Becerra, B., Morrice, N. G., Boronat, A., Hardie, D. G. Ferrer, A. 1995b.

  Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from Arabidopsis thaliana, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by Brassica oleracea 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase kinase. Plant Physiology. 120: 257-274
- Dale, S., Wilson, W. A., Edelman, A. M., Hardie, D. G. 1995a. Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HM-CoA reductase kinase A. yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. FEBS Letters. 361: 191-195.

- 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: 1495-1502.
- Denslow, S., Walls, A., Daub, M. 2005. *Regulation of biosynthetic genes and antioxidant properties of vitamin B6 vitamers during plant defense responses.* Physiological and Molecular Plant Pathology. 66: 244-255.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolaï, M., Bedu, M., Robaglia, C., Meyer, C. 2007. *The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation.* EMBO Reports. 8: 864-870.
- Depuyt, S., Hardtke, C. 2011. *Hormone signaling crosstalk in plant growth regulation*.

  Current Biology. **21:** R365-R363.
- Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B., Meyer, C. 2016.

  \*\*TOR signaling and nutrient sensing.\* Annual Review of Plant Biology. 67: 261-285.
- Dobrenel, T., Marchive, C., Azzopardi, M., Clément, G., Moreau. 2013. *Sugar metabolism* and the plant target of rapamycin kinase: a sweet operaTOR? Frontiers in Plant Science. 4: 93
- Duchêne, A. M., Giegé, P. 2012. *Dual localized mitocondrial and nuclear proteins as gene*expression regulators in plants?. Frontiers in Plant Science. 3: 1-6.
- Emanuelle, S., Doblin, M.S., Stapleton, D.I., Bacic, A., Gooley, P.R. 2016. *Molecular insights into the enigmatic metabolic regulator, SnRK1.* Cell Press. 21: 341-353.
- Feng, J., Zhao, S., Chen, X., Wang, W., Dong, W., Chen, J., Shen, J., Liu, L., Kuang, T. 2015.

  \*\*Biochemical and structural study of Arabidopsis hexokinase 1.\*\* Acta

  \*\*Crystallographica Section D Biological Crystallography. 71: 367-375.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. 1968. *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.* Experimental Cell Research. 50(1): 151-158.
- Gancedo, C., Flores, C.L. 2008. *Moonlighting proteins in yeasts. Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 72: 197-210.
- Gibson, S. I. 2000. *Plant Sugar-Response Pathways.* Part of a Complex Regulatory Web. Plant Physiology. 124: 1532-1539.

- Gibson, S. I. 2003. *Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signaling network.* Journal of Experimental Botany. 55 (395): 253-264.
- Gibson, S. I. 2005. *Control of plant development and gene expression by sugar signaling.*Current Opinion in Plant Biology 8: 93-102.
- Graham, I. A., Denby, K. J., Leaver, C. J. 1994. *Carbon Catabolite Repression Regulates Glyoxylate Cycle Gene Expression in Cucumber.* Plant Cell. 6: 761-772.
- Halford, N. G., Hey, S. J. 2009. *Snf1-related protein kinases (SnKRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signaling in plants.* Biochem J. 419: 247-259.
- Halford, N. G., Hey, S., Jhurreea, D., Laurie, S., McKibbin, R. S., Paul, M., Zhang, Y. 2003.
   Metabolic signaling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase.
   Journal of Experimental Botany. 54(382): 467-475.
- Hardie, D. G., Ross, F. A., Hawley, S. A. 2012. *AMPK: a nutrient and energy sensor that mantains energy homeostasis.* Nature Reviews Molecular Cell Biology. 13: 251-262.
- Harvaux, M., Kloppstech, K. 2001. The protective functions of carotenoid and flavonoid pigments against excess visible radiation at chilling temperature investigated in Arabidopsis npg and tt mutants. Planta. 213: 953-966.
- Havaux, M., Ksas, B., Szewczyk, A., Rumeau, D., Franck, F., Caffarri, S., Triantaphylidès, C. 2009. *Vitamin B6 deficient plant display increased sensitivity to high light and photo-oxidative stress.* BMC Plant Biology. 9: 130-152.
- Heitman, J., Mowa, N. R. Hall, M. N. 1991. *Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast.* Science. 253: 905-909.
- Hernández-Loyola, A. 2019. *Función del dominio amino-terminal en la localización de las hexocinasas de plantas.* Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Hoagland, D., Arnon, D. 1950. *The water-culture method for growing plants without soil.*The College of Agriculture University of California Berkeley.

- Hu, D., Sun, C., Zhang, Q., An, J., You, C., Hao, Y. 2016. *Glucose sensor MdHXK1*phosphorylates and stabilizes MdbHLH3 to promote anthocyanin biosynthesis in apple. PLOS Genetics. 1-27.
- Hu, M., Hui, L., Yingjun Z., Qian, L. 2009. *Photosynthesis and related physiological characteristics affected by exogenous glucose in wheat seedlings under water stress.* Acta Agronomica Sinica. 35: 724-732.
- Huberts H. E. W., van der Klei I. J. 2010. *Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking.* Biochimica et Biophysica Acta. 1803: 520-525.
- Hughes, N. M., Neufeld, H. S., Burkey, K. O. 2005. *Functional role of anthocyanins in high-light winter leaves of the evergreen herb Galax urceolata.* New Phytologist. 168: 575-587.
- Iseli, T. J., Walter, M., van Denderen, B., Katsis, F., Witters, L. A., Kemp, B. E., Michell, B. J. Stapleton, D. 2005. *AMP-activated protein kinase*  $\beta$  *subunit tethers*  $\alpha$  *and*  $\gamma$  *subunits via its C-terminal sequence (186-270).* Journal of Biological Chemistry 280: 13395-13400.
- Jang, J. C., León, P., Zhou, L., Sheen, J. 1997. *Hexokinase as a sugar sensor in higher plants.* The Plant Cell. 9: 5-19.
- Jang, J. C., Sheen, J. 1994. Sugar Sensing in Higher Plants. Plant Cell. 6: 1665-1679.
- Jeffery, C., 1999. *Moonlighting proteins*. Trends in Biochemical Sciences. 24(1): 8-11.
- Jeong, S., Das, P., Jeoung, S., Song, J., Lee, K., Kim Y., Kim, W., Park, Y., Yoo, S., Choi, S., Choi, G., Park, Y. 2010. *Ethylene suppression of sugar-induced anthocyanin pigmentation in Arabidopsis.* Plant Physiology. 154: 1514-1531.
- Jiang, W., Ding, M., Duan, Q., Zhou, Q., Huang, D. 2012. Exogenous glucose preserves the quality of watermelon (Citrullus lanatus) plug seedlings for low temperature storage. Scientia Horticulturae. 148: 23-29
- John, F., Roffler, S., Wicker, T., Ringli, C. 2011. *Plant TOR signaling components.* Plant Signaling & Behavior. 6(11): 1700-1705.

- Jossier, M., Bouly, J. P., Meimoun, P., Arjmand, A., Lessard, P., Hawley, S., Grahame, H. D., Thomas, M. 2009. *SnRK1 (SNF1-related kinase 1) has a central role in sugar and ABA signaling in Arabidopsis thaliana.* Plant Journal. 59: 316-328.
- Kandel-Kfir, M., Damari-Weissler, H., German, M. A., Gidoni, D., Mett, A., Belausov E., Petrikov, M., Adir, N., Granot D. 2006. Two newly identified membrane-associated an plastidic tomato HXKs: characteristics, predicted structure and intracellular localization. Planta. 224: 1341-1352.
- 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: 411-425.
- Karve, R., Lauria, M., Virnig, A., Xia, M., Rauh, B. L., Moore, B. 2010. *Evolutionary lineages* and functional diversification of plant hexokinases. Molecular Plant. 3(2): 334-346.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D.M. *GbL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient sensitive interaction between raptor and mTOR.* Molecular Cell. 11: 895-904.
- Kim, H. B., Cho J. I., Ryoo N., Shin D. H., Park Y. I., Hwang Y. S., Lee S. K., An G., Jeon J. S.
  2016. Role of rice cytosolic hexokinase OsHXK7 in sugar signaling and metabolism. Journal of Integrative Plant Biology. 58: 127–135.
- Kim, Y. M., Heinzel, N., Giese, J. O., Koeber, J., Melzer, M., Rutten, T., Von Wirén, N., Sonnewald, U., Hajirezaei, M. R. 2013. A dual role of tobacco hexokinase 1 in primary metabolism and sugar sensing. Plant Cell and Environment. 36: 1311-1327
- Kraakman, L. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M., De Winde, J. H. 1999. *Structure-function* analysis of yeast hexokinase: structural requirements for triggering cAMP signalling and catabolite repression. Biochemical Journal. 343(1): 159-168.

- Krouk, G., Ruffel, S., Guitérrez, R., Gojon, A., Crawford, N., Coruzzi, G., Benoît, L. 2011. *A framework integrating plant growth with hormones and nutrients.* Trends in Plant Science. **16(4)**: 178-182.
- Kuettner, B. E., Kettner, K., Keim, A., Svergun, D. I., Volke, D., Singer, D., Hoffmann, R., Müller, E. C., Otto, A., Kriegel, T. M., Sträter, N. 2010. Crystal structure of hexokinase KlHxk1 of Kluyveromyces lactis. A molecular basis for understanding the control of yeast hexokinase functions via covalent modification and oligomerization. Journal of Biological Chemistry. 285(52): 41019-41033.
- Kunz, S., Pesquet, E., Kleczkowski, L. 2014. Functional Dissection of Sugar Signals
   Affecting Gene Expression in Arabidopsis thaliana. Public Library of Science ONE.
   9, 1-10.
- Landry, L. G., Chapple, C. C. S., Last, R. L. 1995. Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced Ultraviolet-B injury and oxidative damage. Plant Physiology. 109: 1159-116.
- Lastdrager, J., Hanson, J., Smeekens, S. 2013. *Sugar signals and the control of plant growth and development.* Journal of Experimental Botany. 65(3): 799-807.
- Lauire, S., McKibbin, R. S., Halford, N. G. 2003. *Antisense SNF1 (SnRK1) protein kinase represses transient activity of an \alpha-amylase (\alpha-Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. Journal of Experimental Botany. 54: 457-465.*
- Leegood, R. C., Sharkey, T. D., von Caemmerer, S. 2004. *Advances in Photosynthesis*. Kluwer Academic Publishers. 9: 233-248.
- León, P., Sheen, J. 2003. *Sugar and hormone connections.* Trends in Plant Science. 8(3): 110-116.
- Ljung, K., Nemhauser, J., Perata, P. 2015. *New mechanistic links between sugar and hormone signaling networks.* Current Opinion in Plant Biology. **25**: 130-137.
- Mani, M., Chen, C., Amblee, V., Liu, H., Mathur, T., Zwicke, G., Zabad, S., Patel, B., Thakkar, J., Jeffery, C. 2014. *MoonProt: a database for proteins that are known to moonlight.* Nucleic Acids Research. 43: 277-282.
- Maquat, L. 2002. Nonsense-mediated mRNA decay. Current Biology. 12(6): R196-R197.

- Marchive, C., Roudier, F., Castaings, L., Bréhaut, V., Blondet, E. 2013. *Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants.*Nature Communications. 4: 1713.
- Margalha, L., Valerio, C., Baena-González, E. 2016. AMP-Activated Protein Kinase.
  Chapter 17: Plant SnRK1 Kinases: Structure, Regulation, and Function. Springer
  International Publishing. 107: 404-427
- Mayer, F. V., Heath, R., Underwood, E., Sanders, M. J., Carmena, D., McCartmey, R. R., Leiper, F.C., Xiao, B., Jing, C., Walker, P. A., Hiare, L. F., Ogrodowicz, R., Martin, S. R, Schmidt, M. C., Gamblin, S. J., Carling, D. 2011. ADP regulates SNF1, the Saccharomyces cerevisiae homolog of AMP-Activated protein kinase. Cell Metabolism. 14: 707-714
- Medici, A., Krouk, G. 2014. *The primary nitrate response; a multifaceted signaling*pathway. Journal of Experimental Botany. 65: 5567 5576.
- Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., Robaglia, C. 2002

  Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gen.

  Proceedings of the National Academy of Sciences. 99(9): 6422-6427.
- Meyerhof, O., 1927. Über die enzymatische Milchsäurebildung im Muskelextrakt. III.

  Mitteilung: Die Milchäurebildung aus den gärfähigen Hexosen. Biochemische
  Zeitschrift. 183: 176-215.
- Moghaddam, M., Van den Ende, M. 2013. *Sugars, the clock and transition to flowering.*Frontiers in Plant Science. 4: 1-6.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W., Liu, Y., Hwang, S., Jones, T., Sheen, J. 2003. *Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light and hormonal signaling.* Nature. 300: 332-336.
- Moreau, M., Azzopardi, M., Clément, G., Dobrenel, T., Marchive, C., Renne. C., Martin-Magniette, M., Taconnat, L., Renou, J., Robagli, C., Meyer, C. 2012. *Mutations in the Arabidopsis Homolog of LST8/GβL, a Partner of the Target of Rapamycin Kinase, impair plant growth, flowering and metabolic adaptation to long days.*The Plant Cell. 24: 463 481.

- Murashige, T., Skoog, F. 1962. *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. Physiologia Plantarum. 15(3):773-497.
- Neuhaus, H. E., Emes, M. J. 2000. *Nonphotosynthetic metabolism in plastids.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51: 111-140.
- Nielsen, T. H., Krapp, A., Röper-Schwarz, U., Stitt, M. 1998. *The sugar-mediated regulation of genes encoding the small subunit of Rubisco and the regulatory subunit of ADP glucose pyrophosphorylase is modified by phosphate and nitrogen.* Plant Cell and Environment. 21: 4434-454.
- Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Bläsing, O. 2007. *Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding to carbon-deprived Arabidopsis seedlings.* The Plant Journal. 49: 463 491.
- Palenchar, P. M., Kouranov, A., Lejay, L. V., Coruzzi G.M. 2004. *Genome-wide patterns of carbon and nitrogen regulation of gene expression validate the combined carbon and nitrogen (CN) signaling hypothesis in plants.* Genome Biology. 5: R91
- Polge, C., Thomas, M. 2006. **SNF1/AMPK/SnRK1** kinases, global regulators at the heart of energy control? Trends in Plant Science. 12(1): 20-28.
- Price, J., Laxmi, A., Martin S. K. S., Jang, J. C. 2004. *Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis.* Plant Cell. 16: 2128-2150.
- Purcell, P. C., Smith, A. M., Halford, N. G. 1998. Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tuber and loss of sucrose inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. The Plant Journal. 14: 195-202.
- Rad, S., Clayton, E., Cornelius E., Howes, T., Kohalmi, S. 2018. *Moonlighting proteins:*putting the spotlight on enzymes. Plant Signaling & Behavior 13(10): e1517075-1-e1517075-6.
- Rayson, S., Arciga-Reyes, L., Wootton, L., Zabala, M., Truman, W., Graham, N., Grant, M., Davies, B. 2012. *A role for nonsense-mediated mRNA decay in plants: pathogen*

- responses are induced in Arabidopsis thaliana NMD mutants. PLOS One. 7(2): 1-13
- Ren, M., Venglat, P., Qiu, S., Feng, L., Cao, Y., Wang, E., Xiang, D., Wang, J., Alexander, D., Chalivendra, S. 2012. *Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth and life span in Arabidopsis.* Plant Cell 24: 4850 4874.
- Rexin, D., Meyer, C., Robaglia, C., Veit, B. 2015. *TOR signalling in plants*. Biochemical Journal. 470: 1 14.
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. 2006. *Sugar sensing and signaling in plants:* conserved and novel mechanisms. Annual Review of Plant Biology. 57: 675-709.
- Rook, F., Bevan, M.W. 2002. *Genetic approach to understanding sugar-response*pathways. Journal of Experimental Botany. 54: 495-501.
- Sakr, S., Wang, M., Dédaldéchamp, F., Pérez-García, M. D., Ogé, L., Hamama, L., Atanassova, R. 2018. The sugar-signaling hub: overview of regulators and interaction with the hormonal and metabolic network. International Journal of Molecular Sciences. 19: 1-42.
- Sakr, S., Wang, M., Dédaldéchamp, F., Pérez-García, M., Ogé, M., Hamama, L., Atanassova,
   R. 2018. The sugar-signaling Hub: Overview of regulators and interaction with hormonal and metabolic network. International Journal of Molecular Sciencies.
   19: 1-42.
- Saltman, P., 1953. *Hexokinase in higher plants.* Journal of Biological Chemistry. 200, 145-154.
- Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., Hayat, S. 2016. *Role of sugars under abiotic* stress. Plant Physiology and Biochemistry. 109: 54-61
- Scott, P. 2008. *Physiology and behavior of plants.* John Wiley & Sons, Ltd. 43-39.
- Shaul, O. 2015. *Unique aspects of plant nonsense-mediated mRNA decay.* Trends in Plant Science. 20(1): 767-779.
- Sheen, J. 1990. *Metabolic Repression of Transcription in Higher Plants.* Plant. Cell. 2, 1027-1038.

- Sheen, J. 1994. *Feedback control of gene expression.* Photosynthesis Research. 39: 427-438.
- Smeekens, S. 2000. *Sugar-Induced Signal Transduction in Plants.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 51: 49-81.
- Smeekens, S., 1998. *Sugar regulation of gene expression in plants.* Current Opinion in Plant Biology 1: 230-234
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J., Rolland, F. 2009. *Sugar signals and molecular networks controlling plant growth.* Current Opinion in Plant Biology. 13: 1-6.
- Sorowar, S., Lee, J., Ahn, E., Pai, H. 2008. A role of hexokinases in plant resistance to oxidative stress and pathogen infection. Journal of Plant Biology. 51(5): 341-346.
- Sriram, G., Martínez, J. A., McCabe, E. R. B., Liao, J. C., Dipple, K. M. 2005. *Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play?* American Journal of Human Genetics. 76: 911-924.
- Stitt, M., Krapp, A. 1999. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. Plan Cell and Environment. 22: 583-621.
- Sugden, C., Donaghy, P. G., Halford, N. G., Hardie, D. G. 1999. Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. Plant Physiology. 120: 257-274.
- Sun, M., Ma, Q., Hu, D., Zhu, X., You, C., Shu, H., Hao, Y. 2018. *The glucose sensor MdHXK1 Phosphorylates a Tonoplast Na+/H+ Exchanger to improve salt tolerance.* Plant Physiology. 176: 2977-2990.
- Sun, M., Ma, Q., Hu, Q., Zhu, X., You, C., Shu, H., Hao, Y. 2018. The glucose sensor MdHXK1 Phosphorylates a Tonoplast Na+/H+ exchanger to improve salt tolerance. Plant Physiology. 176: 2977-2990.
- Tanimoto, E. 2005. *Regulation of root growth by plant hormones roles for auxin and gibberellin.* Critical Reviews in Plant Sciences. **24(4):** 249-265.

- Teng, S., Keurentjes, J., Bentsink, L., Koorneef, M., Smeekens, S. 2005. *Sucrose-specific induction of anthocyanin biosynthesis in Arabidopsis requires the MYB75/PAP1 gene.* Plant Physiology. 139: 1840-1852
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. A., Rhee, S. Y., Stitt, M. 2004. *Mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers.* Plant Journal. 35: 490-500.
- Thum, K., Shin, M., Palenchar, P., Kouranov, A., Coruzzi, G. 2004. *Genome-wide investigation of light and carbon signaling interactions in Arabidopsis.* Genome Biology. 5: R10-R10.20
- Turgeon, R. 1989. *The sink-source transition in leaves*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 40: 119-138.
- Ulfstedt, M., Hu, G., Eklund, D., Ronne, H. 2018. The ability of a charophyte alga hexokinase to restore glucose signaling and glucose repression of gene expression in a glucose-insensitive Arabidopsis hexokinase mutant depends on its catalytic activity. Frontiers in Plant Science. 89: 1-15.
- Villadsen, D., Smith, S. 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: 467-477.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M., Cresti, M. 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. Electrophoresis. 27: 2782-2786.
- Wingler, A., Masclaux-Daubresse, C., Fischer, A.M. 2009. *Sugars, senescing and ageing in plants and heterotrophic organisms.* Journal of Experimental Biology. 60: 1063-1066.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N. 2006. *TOR signaling in growth and metabolism.*Cell. 124: 471-484.

- Xiao, W., Sheen, J., Jang, J.C. 2000. *The role of hexokinases in plant sugar signaling transduction and growth and development.* Plant Molecular Biology 44: 451-461.
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., Sheen, J. 2013. *Glucose-TOR signaling* reprograms the transcriptome and activates meristems. Nature. 496: 18-186.
- Yang, H., Rudge, D., Koos, J., Vaidialingam, B., Yang, H. I., Pavletich, N. 2003. *mTOR kinase* structure, mechanism and regulation. Nature. 497: 217-224.
- Yip, C., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D., Kang, S. 2010. *Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition.* Molecular Cell. 38: 768-774.
- Young-Hee, C., Sang-Dong, Y., Sheen, J. 2006. *Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase1 Complex in glucose signaling*. Cell. 127: 579-589.
- 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: 6157-6166.
- Zhong-Wei Z., Shu Y., Fei X. Hui Y., Nian-Hui Z, Jian C., Hong-Hui L. 2010. *The plastid hexokinase pHXK: A node of convergence for sugar and plastid signals in Arabidopsis.* FEBS Letters. 584 (16): 3573-3579.

#### 14. Anexos

# Anexo I. Solución Hoagland [Hoagland & Arnon, 1950]

Para preparar un litro de solución Hoagland se agregan las cantidades señaladas en la cuarta columna de la Tabla 7 y también se agregan 1.5 mL de FeNaEDTA a una concentración de 0.15 mg/mL.

El pH se ajusta a 6.0 utilizando KOH 0.1 M o con  $H_2SO_4$  0.1 M.

Tabla 8. Macronutrientes y micronutrientes usados para la preparación de solución Hoagland

	Macronu	ıtrientes	
Componente	Concentración final	Cantidad para 50 mL de Stock	Volumen de Stock para 1 L de solución
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM	6.8045 g	1 mL
KNO <sub>3</sub>	5 mM	5.0550 g	5 mL
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	5 mM	11.8075 g	) IIIL
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	2 mM	12.3240 g	2 mL
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	46.00 μM	0.7149 g	
MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O	9.10 μΜ	0.4527 g	
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.97 μΜ	0.0694 g	100 μL
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0.32 μΜ	0.0199 g	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0.12 μΜ	0.0075 g	

# Anexo II. Composición del Medio Murashige & Skoog [Murashige & Skoog, 1962]

# A. Compuestos inorgánicos

a.	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.0 mg
b.	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 mg
c.	CaCl <sub>2</sub>	332.2 mg
d.	CoCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0.025 mg
e.	CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0.025mg
f.	Na₂EDTA	37.25 mg
g.	FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	27.85 mg
h.	MgSO <sub>4</sub>	180.7 mg
i.	$MnSO_4 \cdot H_2O$	16.9 mg
j.	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25 mg
k.	KI	0.83 mg
l.	KNO <sub>3</sub>	1900.0 mg
m.	$KH_2PO_4$	170.0 mg
n.	ZnSO <sub>4</sub>	8.6 mg
B. Agua	c.b.p.	1000 mL

# Anexo III. Composición del Medio Gamborg [Gamborg *et al.*, 1968]

# A. Compuestos inorgánicos

a.	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134.0 mg
b.	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.0 mg
c.	CaCl <sub>2</sub>	113.24 mg
d.	CoCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0.025 mg
e.	CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0.025mg
f.	Na <sub>2</sub> EDTA	37.25 mg
g.	FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	27.85 mg
h.	MgSO <sub>4</sub>	122.09 mg
i.	MnSO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	10.0 mg
j.	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25 mg
k.	KI	0.75 mg
l.	KNO <sub>3</sub>	2500.0 mg
m.	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	130.5 mg
n.	ZnSO <sub>4</sub>	2.0 mg

#### B. Compuestos orgánicos

		actes e. Barries	
	a.	Mioinositol	100.0 mg
	b.	Ácido nicotínico	1.0 mg
	c.	Hidrocloruro de piridoxina	1.0 mg
	d.	Hidrocloruro de tiamina	10.0 mg
C.	Agua c	c.b.p.	1000 mL

#### Anexo IV.

#### Amortiguadores y soluciones para elaboración de geles de agarosa

#### A. Agua libre de RNasas

a.	Dietilpirocarbonato	1 mL
b.	Agua c.b.p.	1 L

El dietilpirocarbonato se agregó al agua y se dejó en agitación constante durante toda la noche. Al día siguiente, la mezcla se esterilizó en autoclave durante 30 min para inactivar el dietilpirocarbonato restante.

#### B. Amortiguador TAE 50x

a.	Tris	242.0 g
b.	Ácido acético glacial	57.1 mL
c.	EDTA disódico	4.6525 g
d.	Agua c.b.p.	1000 mL

#### C. Gel de agarosa al 2%

a.	Agarosa	0.7 g
b.	Amortiguador TAE 50x	0.7 mL
c.	Agua c.b.p.	35 mL
d.	Bromuro de etidio 0.5mg/mL	35 μL

Los primeros tres componentes se calentaron en un horno de microondas por lapsos de 10 s hasta que la agarosa estuviera completamente disuelta. El bromuro de etidio se agregó cuando la temperatura de la mezcla estaba a una temperatura menor.

#### D. Amortiguador de corrida (TAE 1x)

a.	Amortiguador TAE 50x	20 mL
b.	Agua c.b.p.	1000 mL

#### Anexo V.

# Amortiguadores y soluciones para extracción de proteína total [Wang et al., 2006]

A. Ácido tricloroacético al 10 % en aceto	A. Á	en acetona
---	------	------------

a.	Ácido tricloroacético	10 mL
b.	Acetona c.b.p.	100 mL

#### B. Acetato de amonio 0.1 M en metanol al 80%

a.	Acetato de amonio	7.7082 g
b.	Metanol	80 mL
c.	Agua c.b.p.	100 mL

# D. Amortiguador denso-SDS

a.	Sacarosa	30 g
b.	SDS	2 g
c.	Tris	0.1211 g
d.	$\beta$ -mercaptoetanol	5 mL
e.	Agua c.b.p.	100 mL

### E. Fenol:Amortiguador denso SDS 1:1

a.	Fenol	50 mL
b.	Amortiguador denso SDS	50 mL

Anexo VI.

Amortiguadores y soluciones para elaboración de geles de acrilamida-SDS y tinción con azul de Coomasie.

A.	Gel concentrador Acrilamida:Bisacrilamida 30:0.8 Tris-HCl 2 M pH 8.8 SDS al 20% Agua Persulfato de amonio al 10% TEMED	660 μL 600 μL 25 μL 3.672 mL 40 μL 2.5 μL
B.	Gel separador al 12 % Acrilamida:Bisacrilamida Amortiguador pH 8.8 SDS al 20 % Agua Persulfato de amonio al 10 % TEMED	2 mL 1 mL 25 μL 1.943 mL 40 μL 2 μL
C.	Amortiguador de carga Tris-HCl 1M pH 6.8 SDS al 20 % Glicerol al 50 % Ditiotreitol 1 M Azul de bromofenol al 20 % Agua c.b.p.	350 μL 250 μL 150 μL 160 μL 20 μL 1000 μL
D.	Amortiguador de corrida Tris Base Glicina SDS Agua c.b.p.	6.06 g 18.53 g 10 g 1 L
E.	Solución fijadora Ácido acético glacial Agua c.b.p.	100 mL 1000 mL
F.	Solución teñidora Azul de Coomasie Metanol Ácido acético glacial	1.5 g 375 mL 200 mL

Agua c.b.p. 1500 mL

G. Solución desteñidora
Etanol 375 mL
Ácido acético glacial 75 mL
Agua 375 mL

#### Anexo VII.

#### Amortiguadores y soluciones para inmunoréplica tipo Western

### A. Amortiguador de transferencia

a.	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M	7.5 mL
b.	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M	7.5 mL
c.	Metanol	200 mL
d.	SDS al 10%	5 mL
e.	Agua c.b.p.	1000 mL

# B. Amortiguador TBS

a.	Tris	2.4228 g
b.	NaCl	8.7675 g
c.	Agua c.b.p.	1000 mL

#### C. Amortiguador TTBS

a.	Tween 20	1 mL
b.	Amortiguador TBS c.b.p.	1000 mL

#### D. Solución bloqueadora

a.	BLOT-QuickBlocker Reagent (Merck)	5 g
b.	Amortiguador TTBS c.b.p.	1000 mL