



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**FUNCIÓN DEL DOMINIO AMINO-TERMINAL EN LA LOCALIZACIÓN DE LAS  
HXKs DE PLANTAS**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:  
ALEJANDRO HERNÁNDEZ LOYOLA**

**TUTOR PRINCIPAL  
Dra. Sobeida Sánchez Nieto – Facultad de Química**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Alejandro Sosa Peinado – Facultad de Medicina  
Dr. Salvador Uribe Carvajal – Instituto de Fisiología Celular**

**Ciudad de México. Agosto, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

El trabajo de tesis “FUNCIÓN DEL DOMINIO AMINO-TERMINAL EN LA LOCALIZACIÓN DE LAS HEXOCINASAS DE PLANTAS” realizado por Alejandro Hernández Loyola fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la M. en C. Beatriz King Díaz se le agradece su apoyo técnico en el mantenimiento de las condiciones de trabajo y manejo de recursos para el desarrollo del trabajo.

A la Dra. Karina Jiménez Durán y al M en C José Alfredo Jiménez por su asesoría en el uso del microscopio confocal.

Al honorable jurado, por sus atinadas correcciones y comentarios acerca del trabajo escrito, el cual fue conformado por:

Dra. Marina Gavilanes Ruiz

Dra. Aurora Lara Nuñez

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

Dra. Xochitl Pérez Martínez

Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

Un agradecimiento enorme a Sci-hub por romper las barreras socioeconómicas del acceso a los reportes científicos.

### **El trabajo de tesis recibió financiamiento a través de:**

- CONACyT SEP-Ciencia Básica proyecto 239605
- Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9125.
- Beca CONACyT para estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas (Número de beca: 620019).
- Agradecimiento a PAEP por el apoyo para asistir a los congresos:  
XX Congreso de Bioenergética y biomembranas. Chautla, Puebla. 2017.  
ASPB Plant Biology. Montréal, Canada. 2018.

## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
<b>ATP</b>	Adenosín-trifosfato	<b>mTP</b>	Mitochondrial target peptide
<b>CAA</b>	Anhidrasa carbónica	<b>NLS</b>	Nuclear localization signal
<b>CAB</b>	Proteína de unión a clorofila	<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>cDNA</b>	DNA complementario	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico	<b>RPT5B</b>	Partícula 5B del proteosoma
<b>Fru</b>	Fructosa	<b>Sac</b>	Sacarosa
<b>gin 2-1</b>	Insensible a Glucosa	<b>SBP</b>	Sedoheptulosa bifosfatasa
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein	<b>TF</b>	Factor de transcripción
<b>Glu</b>	Glucosa	<b>VHA-B1</b>	Subunidad B1 de la ATPasa vacuolar de protones
<b>G6P</b>	Glucosa-6-fosfato		
<b>HXK</b>	Hexocinasa		
<b>HXL</b>	Hexocinasa-like		
<b>INV</b>	Invertasa		
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa		
<b>Man</b>	Manitol		

<b>Índice</b>	
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>2</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>3</b>
<b>Índice</b> .....	<b>4</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>7</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>8</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>9</b>
Proteínas “moonlighting” o multifuncionales. ....	9
Hexocinasas. ....	11
Función catalítica. ....	11
Estructura de las hexocinasas. ....	13
Localización subcelular de las hexocinasas en plantas. ....	16
Las otras funciones de la Hexocinasa. ....	18
<b>La HXK es un sensor de la abundancia de azúcares.</b> .....	<b>18</b>
<b>La HXK de manzana es una cinasa de proteínas.</b> .....	<b>22</b>
Mecanismos de transporte de proteínas hacia el núcleo. ....	23
<b>Justificación</b> .....	<b>28</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>29</b>
<b>Objetivo</b> .....	<b>30</b>
Objetivos particulares .....	30
<b>Desarrollo experimental</b> .....	<b>31</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>32</b>
Análisis <i>in silico</i> de las HXKs. ....	32
<b>Identificación de las secuencias de localización nuclear en las HXKs de maíz.</b> .....	<b>32</b>
<b>Predicción de la estructura terciaria de las hexocinasas mitocondriales de maíz</b> .....	<b>32</b>
Producción de versiones truncas de ZmHXK6. ....	33
Amplificación de las secuencias mediante PCR. ....	33
Electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. ....	34
Recuperación del DNA de los fragmentos de agarosa. ....	35
Inserción de los amplicones en el vector de entrada pDONR 221. ....	35
Reacciones de recombinación para insertar el transgene en el vector de expresión en planta. ....	35
Transformación de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ con las construcciones. ....	36
Extracción y purificación de los vectores que codifican para ZmHXK6 y sus versiones truncas de las cepas de <i>E. coli</i> . ....	37
Obtención del vector pAG426GPD-ccdB-EGFP-ZmHXK6 y ZmHXK6 $\Delta$ 30 para la expresión en levadura. ....	37
Localización subcelular de HXKs en protoplastos de plantas .....	38
Aislamiento de protoplastos (Yoo, Cho, y Sheen, 2007). ....	38
Transfección DNA-PEG-Ca <sup>2+</sup> .....	40

Tinción nuclear de los protoplastos.....	41
Localización de ZmHXK6 y ZmHXK $\Delta$ 30 en levaduras. ....	42
Transformación de levaduras de alta eficiencia. ....	42
Visualización en microscopio confocal. ....	43
Obtención de plantas sobreexpresoras de ZmHXK6 $\Delta$ 30. ....	44
Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . ....	44
Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . ....	44
Crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	45
Transformación de plantas de <i>Arabidopsis</i> por el método de inmersión floral. ....	45
Obtención de plantas homocigotas. ....	45
Evaluación genotípica de las plantas sobreexpresoras ....	46
Obtención de cDNA a partir de RNA total. ....	47
PCR para amplificar el gen de ZmHXK6 $\Delta$ 30 usando cDNA de las plantas sobreexpresoras. ....	48
Evaluación fenotípica de las plantas sobreexpresoras. ....	48
<b>Resultados</b> .....	<b>50</b>
Tres HXKs de maíz presentan una posible secuencia de localización nuclear o NLS. ....	50
Producción de las versiones truncas de ZmHXK6 como proteína de fusión con GFP. ....	52
ZmHXK6 $\Delta$ 30 se localiza en el núcleo de protoplastos de <i>Arabidopsis</i> . ....	53
ZmHXK6 tiene una región N-terminal distinta a las otras HXKs de maíz. ....	64
Las plantas de <i>Arabidopsis</i> sobreexpresoras de ZmHXK6 $\Delta$ 30 presentan un crecimiento mayor que las plantas de <i>Arabidopsis</i> silvestres. ....	70
<b>Discusión</b> .....	<b>74</b>
La remoción de la región mTP es la responsable de que ZmHXK6 se encuentre en el núcleo. ....	74
ZmHXK6 es una proteína con posible localización dual. ....	77
La sobreexpresión de ZmHXK6 $\Delta$ 30 mejora el crecimiento de la planta de <i>Arabidopsis</i> y reduce su sensibilidad a glucosa. ....	81
<b>Conclusiones</b> .....	<b>83</b>
<b>Perspectivas</b> .....	<b>84</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>91</b>
I. Tabla de los oligonucleótidos utilizados durante la clonación. ....	91
II. Alineamiento de las secuencias de nucleótidos de HXK. ....	92
III. Resultados de la secuenciación de las clonas obtenidas para las versiones truncas de ZmHXK6. ....	93
IV. Resultados de la secuenciación de las clonas obtenidas para las versiones truncas de ZmHXK6 en secuencia de proteínas. ....	95
V. Mapa del vector pEarley Gate 103. ....	96

## Índice de figuras.

<b>Figura 1.</b> Estructura cristalográfica de AtHXK1 libre y unida a sustrato.	14
<b>Figura 2.</b> Interacción de AtHXK1 con ATP y con glucosa.	15
<b>Figura 3.</b> Diagrama de la localización de los cuatro tipos de hexocinasas en plantas (A-D).	17
<b>Figura 4.</b> Complejo heterotrimérico.	20
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de importe de proteínas al núcleo mediado por NLS.	25
<b>Figura 6.</b> Diferentes mecanismos por los cuales una proteína puede poseer más de un blanco subcelular.	28
<b>Figura 7.</b> Esquema general del desarrollo experimental.	32
<b>Figura 8.</b> Alineamiento del extremo amino-terminal de las diferentes HXK.	52
<b>Figura 9.</b> Diagrama de las diferentes versiones de ZmHXK6 producidas.	54
<b>Figura 10.</b> Observación de la tinción de protoplastos de <i>A. thaliana</i> con el colorante DAPI.	55
<b>Figura 11.</b> Tinción de protoplastos de <i>A. thaliana</i> con el colorante Hoechst.	56
<b>Figura 12.</b> Protoplastos expresando la proteína ZmHXK6 $\Delta$ 30-GFP teñidos con Hoechst.	57
<b>Figura 13.</b> Expresión heteróloga de 35S:GFP y ZmHXK6-GFP en protoplastos de <i>A. thaliana</i> .	59
<b>Figura 14.</b> Ensayos de localización subcelular de las proteínas de fusión en <i>S. cerevisiae</i>	60
<b>Figura 15.</b> Expresión de las versiones truncas de ZmHXK6 en protoplastos de <i>A. thaliana</i> .	62
<b>Figura 16.</b> Las HXKs de maíz se localizan tanto en núcleo como en citoplasma.	64
<b>Figura 17.</b> Protoplastos de <i>Z. mays</i> transfectados con las versiones truncas de ZmHXK6.	65
<b>Figura 18.</b> Modelo de ZmHXK6 por I-TASSER.	67
<b>Figura 19.</b> Modelos de las 4 hexocinasas mitocondriales de maíz, la HXK1 de manzana ( <i>Malus domestica</i> ) y la HXK1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	68
<b>Figura 20.</b> Superposición de los modelos obtenidos para AtHXK1, MdHXK1 y ZmHXK9.	69
<b>Figura 21.</b> Modelado de los dominios N-terminal de las HXKs de <i>A. thaliana</i> , <i>Z. mays</i> y <i>M. domestica</i> .	70
<b>Figura 22.</b> Las plantas de <i>A. thaliana</i> sobreexpresoras presentan los transcritos para ZmHXK6 $\Delta$ 30.	71
<b>Figura 23.</b> Crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis</i> silvestres (wt), <i>gin 2-1</i> y sobreexpresoras en agar con y sin glucosa.	72
<b>Figura 24.</b> Crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis</i> silvestres (wt), <i>gin 2-1</i> y sobreexpresoras en MS con y sin glucosa.	73
<b>Figura 25.</b> Crecimiento de plantas de <i>Arabidopsis</i> silvestres (wt), <i>gin 2-1</i> y sobreexpresoras en medio Gamborg con y sin glucosa.	74

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Localización y tipo de las Hexocinasas de arroz, maíz y <i>Arabidopsis</i> .	21
<b>Tabla 2.</b> Número de acceso de las HXKs analizadas y comparadas en este trabajo.	33
<b>Tabla 3.</b> Características de las construcciones obtenidas.	34
<b>Tabla 4.</b> Reactivos para la amplificación por PCR.	35
<b>Tabla 5.</b> Volúmenes de reacción BP.	36
<b>Tabla 6.</b> Cantidad de reactivos para la reacción LR.	37
<b>Tabla 7.</b> Cantidades de reactivos para llevar a cabo la reacción LR.	38
<b>Tabla 8.</b> Componentes de la T-mix.	44
<b>Tabla 9.</b> Componentes para la preparación de muestra de RNA.	48
<b>Tabla 10.</b> Componentes de la mezcla de reacción de retrotranscripción	48
<b>Tabla 11</b> Programa de temperatura del termociclador	49
<b>Tabla 12.</b> Identificación de la secuencia NLS en diferentes HXKs mediante análisis <i>in silico</i> .	51
<b>Tabla 13.</b> Secuencias de los oligonucleótidos utilizados durante la clonación.	91

## Resumen

Las hexocinasas (HXK) son enzimas multifuncionales, poseen una función esencial en el metabolismo de los azúcares y perciben la abundancia de glucosa (Glu) modificando la expresión de genes. La represión del gen *CAB2* involucra la formación de un complejo entre AtHXK1, proteína mitocondrial, y dos proteínas con funciones no relacionadas a la HXK y de localización no nuclear: VHA-B1 (subunidad B1 de la ATPasa vacuolar) y RPT5B (partícula 5B del proteosoma 26S). El complejo se localiza en el núcleo, pero se desconoce el mecanismo por el cual la HXK llega allí. OsHXK5 y OsHXK6 presentan una señal de anclaje a la mitocondria (mTP) y otra de localización nuclear (NLS), sugiriendo que la translocación al núcleo es esencial en la señalización.

En el grupo de trabajo se ha demostrado previamente que en maíz, la remoción de 30 aminoácidos en la región N-terminal de ZmHXK4, 5, 6 y 9 cambia su localización de la mitocondria al citoplasma, excepto para ZmHXK6 $\Delta$ 30, que forma agregados que podrían ser de localización nuclear. Mediante experimentos de "pull down" usando a ZmHXK6 $\Delta$ 30 como carnada se encontró que interactúa con VHA-B1, por lo que ZmHXK6 es un buen candidato para estudiar el mecanismo de translocación de la HXK al núcleo, siendo primordial saber si esta proteína en verdad se localiza en el núcleo, si el extremo N-terminal es el responsable de su movilización dentro de la célula y la funcionalidad de una HXK sin capacidad de asociarse a la mitocondria *in planta*.

Como primer paso para entender el mecanismo de translocación de la HXK de la mitocondria al núcleo se planteó determinar si ZmHXK6 tiene una NLS funcional. Para alcanzar el objetivo se produjeron tres versiones truncas: 1. Eliminando solo el mTP (ZmHXK6 $\Delta$ mTP), 2. El mTP y el primer grupo de argininas de la posible secuencia NLS (ZmHXK6 $\Delta$ mTP  $\Delta$ NLS1) y 3. El mTP y toda la posible NLS (ZmHXK6 $\Delta$ mTP $\Delta$ NLS2). Además, de usar a ZmHXK6 $\Delta$ 30 que carece de  $\Delta$ mTP y dos residuos de aminoácidos más. Todas las versiones se clonaron unidas a GFP y fueron usadas para transformar protoplastos de plantas y levaduras, para su análisis por microscopía confocal.

Se observó que todas las versiones truncas se localizaban en el núcleo, tanto en protoplastos de *Arabidopsis* como de *Zea mays*, pero no en levadura. Sugiere que la sola pérdida de la región mTP provoca la translocación de ZmHXK6 al núcleo y que la maquinaria para la translocación al núcleo es exclusiva de plantas. Como perspectiva se plantea expresar la NLS-GFP en protoplastos de plantas para determinar si es funcional.

Además, se produjo una planta de *Arabidopsis* sobreexpresora de ZmHXK6 $\Delta$ 30, encontrándose que crecen mejor que las plantas silvestres. Falta determinar si la sobreexpresión de ZmHXK6 o de ZmHXK6 $\Delta$ NLS2 produce un fenotipo similar a las sobreexpresoras ZmHXK6 $\Delta$ 30 o si presentan respuestas distintas de crecimiento ante la concentración de azúcares, lo que aportaría evidencia de la importancia de la localización de la HXK para transducir la señal de abundancia de azúcares al núcleo.

## Introducción

### Proteínas “moonlighting” o multifuncionales.

Las proteínas “moonlighting” son una clase de proteínas en las que una sola cadena polipeptídica lleva a cabo múltiples funciones bioquímicas. Estas proteínas no son producto de la fusión de genes o variantes producidas por el splicing alternativo o por efectos pleiotrópicos (Zwicke et al., 2014). Se sugiere que son el producto de la presión evolutiva en los seres vivos (Jeffery, 2017) encontrándose ejemplos en plantas, animales, levaduras y procariontes (Huberts y van der Klei, 2010).

Las primeras proteínas que se consideraron “moonlighting” fueron las denominadas cristalinas, en específico las variantes taxón-específicas que se encuentran en la superficie del ojo de algunos organismos y que son idénticas a nivel de secuencia con otras proteínas con actividad catalítica. La cristalina  $\epsilon$  (épsilon), encontrada en la retina del ojo de los patos funcionando como una proteína refractiva posee la misma secuencia de aminoácidos que la lactato deshidrogenasa (LDH) B4, así como una actividad similar a la de la (LDH) purificada a partir de corazón de pato (Piatigorsky y Wistow, 1989). Por otra parte, la cristalina  $\tau$  encontrada en las tortugas, tiene la misma secuencia que la de la  $\alpha$ -enolasa, sin embargo, su actividad es 5 veces menor que la de la enolasa purificada de músculo de conejo (Wistow et al., 1989).

Mediante ensayos de hibridación Southern se demostró que un mismo gen codifica para la cristalina  $\epsilon$  y la LDH, así como el gen que codifica para la cristalina  $\tau$  y la  $\alpha$ -enolasa es el mismo (Hendriks et al., 1988; Wistow et al., 1989). Pero hay 25 veces más transcritos que codifican para estas proteínas en el lente del ojo de pato que en el hígado del mismo animal. De esta manera la célula le añade un mayor espectro de funciones a una proteína sin alterar el tamaño del genoma (Piatigorsky y Wistow, 1989).

La existencia de este tipo de enzimas cobra sentido al considerar el gasto energético que exige la síntesis de proteínas para las células, de manera que una estrategia económica que han desarrollado los organismos es el diseño de proteínas con

varias funciones. Además, no sólo la localización en el tejido cambia su función sino también su localización subcelular. Esto proporciona un mecanismo alternativo de respuesta a estímulos ambientales que energéticamente no es tan demandante para la célula puesto que no involucra la síntesis de proteínas *de novo* (Jeffery, 2017).

En 2011, Menachem, et al. acuñaron un término para referirse a éstas proteínas que se encuentran en dos o más distintos compartimentos celulares y que están compuestas por la misma secuencia de aminoácidos: ecoformas ('echoform' en inglés), una palabra compuesta por el griego echo que significa repetición. Y así diferenciarlas de las isoformas. Además, el grupo de trabajo encontró que un tercio de las proteínas mitocondriales de la levadura presentan doble localización, lo que demuestra que la generación de ecoformas es un mecanismo muy utilizado por la célula para responder de manera rápida a estímulos aunado a que las proteínas con doble blanco celular están mucho más conservadas que las que sólo tienen una localización subcelular (Kisslov et al., 2014).

Estas proteínas son motivo de amplio estudio debido a la posibilidad de encontrar nuevas funciones en enzimas ya caracterizadas. La base de datos MoonProt (Actualizada en el 2018 a MoonProt 2.0; <http://www.moonlightingproteins.org>; Chen et al., 2018; Zwicke et al., 2014), la cual es curada manualmente, documenta a las proteínas en las que se ha demostrado experimentalmente su función "moonlighting". En esta base de datos encontramos a AtHXK1, una hexocinasa (HXK) de *Arabidopsis thaliana*.

## Hexocinasas.

La función más conocida de las HXKs se ha investigado desde hace más de 50 años. La enzima transforma a la glucosa (Glu) en glucosa-6-fosfato (G6P), metabolito clave para varias vías metabólicas como la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato, la síntesis de nucleósidos glicosilados entre otras (Granot et al., 2013).

En los últimos 20 años se encontró que la HXK no solo es capaz de fosforilar a la Glu sino también puede llevar cabo un control sobre la expresión génica, función que se ha demostrado ser independiente de su actividad de fosforilación de hexosas (Xiao et al., 2000; Moore et al., 2003; Hu et al., 2016; Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017). Adicionalmente, se le puede localizar en distintos compartimentos celulares (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017).

## Función catalítica.

La HXK cataliza la transferencia del fosfato  $\gamma$  del ATP hacia el carbono 6 de una hexosa o pentosa. Regularmente este carbohidrato es Glu, aunque también puede utilizar como sustrato a otros azúcares como fructosa (Fru) y manosa pero con menor afinidad (Van Schaftingen, 2013). En plantas es la única enzima capaz de fosforilar a la Glu (Granot et al., 2013).

El número de miembros de la familia de HXKs en plantas es variable. Por ejemplo, *Triticum aestivum* posee 26 genes, *Oryza sativa*, 10 genes, *Nicotiana tabacum*, 9 genes, *Zea mays*, 9 genes, *Arabidopsis thaliana*, 6 genes y *Solanum lycopersicum* 4 genes (Cho et al., 2006a; Kim et al., 2006; Karve et al., 2010; Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017; Aguilera-Alvarado et al., 2019). Sin embargo, solo algunos miembros de cada familia de HXKs han sido caracterizados en su función de cinasa y/o como proteínas sensoras, por lo que se desconoce el papel que cada una de las HXKs juega en la célula.

Una de las familias de HXKs más estudiadas es la de *A. thaliana*, conformada por 6 isoformas, de las cuales sólo 3 poseen actividad catalítica (AtHXK1, AtHXK2 y

AtHXK3) y las tres restantes, a pesar de poseer una gran similitud se secuencia (45-80 % de identidad) con las HXKs, son catalíticamente inactivas, por lo que se les denomina HKL o “Hexokinase-like” (Moore et al., 2003; Cho et al., 2006b). En *Arabidopsis*, se ha estudiado a AtHKL1 y aunque no tiene actividad catalítica posee una función sensora de la abundancia de Glu y está relacionada con la señalización por etileno (Karve et al., 2012). AtHXK1 y AtHXK2 poseen función catalítica de hexocinasa y de sensor de la abundancia de glucosa (Xiao et al., 2000; Moore et al., 2003; Cho et al., 2006b; Karve et al., 2008). Otro rasgo importante de las HXKs es que pueden estar compartimentalizadas en algún organelo celular específico. En el caso de *A. thaliana* se conoce que de las tres HXKs catalíticas hay dos mitocondriales (*AtHXK1* y *AtHXK2*) y una localizada en el cloroplasto, *AtHXK3* (Jang et al., 1997; Karve et al., 2008).

Pocas familias de HXKs de cultivos de importancia agronómica han sido estudiadas, por ejemplo, arroz posee 10 genes codificantes para HXKs, de ellos, cuatro han sido estudiados a profundidad. OsHXK5 y OsHXK6 son proteínas mitocondriales capaces de translocarse al núcleo (Cho et al., 2009). Estas dos, junto con OsHXK7, son proteínas sensoras de la abundancia de Glu (Cho et al., 2009; Kim et al., 2016). Todas fueron evaluadas en su actividad catalítica en el sistema de complementación de la levadura YSH7.4-3C (*hvk1*, *hvk2*, *glk1*) y OsHXK4 presenta actividad al eliminar genéticamente la secuencia correspondiente al péptido de tránsito al cloroplasto (Cho et al., 2006a). Maíz posee una familia con 9 miembros, y de estos, ZmHXK3a, ZmHXK3b y ZmHXK10 se predicen como HKL, mientras que ZmHXK4-9 son catalíticas. Aguilera-Alvarado y colaboradores (2019) demostraron que estas seis HXKs sí presentan actividad catalítica, aunque ZmHXK9 presentó muy baja actividad y no fue posible obtener sus parámetros cinéticos. ZmHXK4, 5, 6 y 7 tienen una Km para Glu similar, entre 66 y 195  $\mu\text{M}$ , mientras ZmHXK8 presenta una Km para Glu de 4.6 mM. Las HXKs de maíz tienen una Km para ATP entre 135 a 198  $\mu\text{M}$ , excepto ZmHXK7 que presenta una Km de 29  $\mu\text{M}$ . Ninguna HXK de maíz se localiza en el cloroplasto, ZmHXK4-6 y 9 se localizan en la mitocondria, mientras que ZmHXK7 y ZmHXK8 en el citoplasma (Aguilera-Alvarado et al., 2019), además de ensayos de complementación de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes *gin*

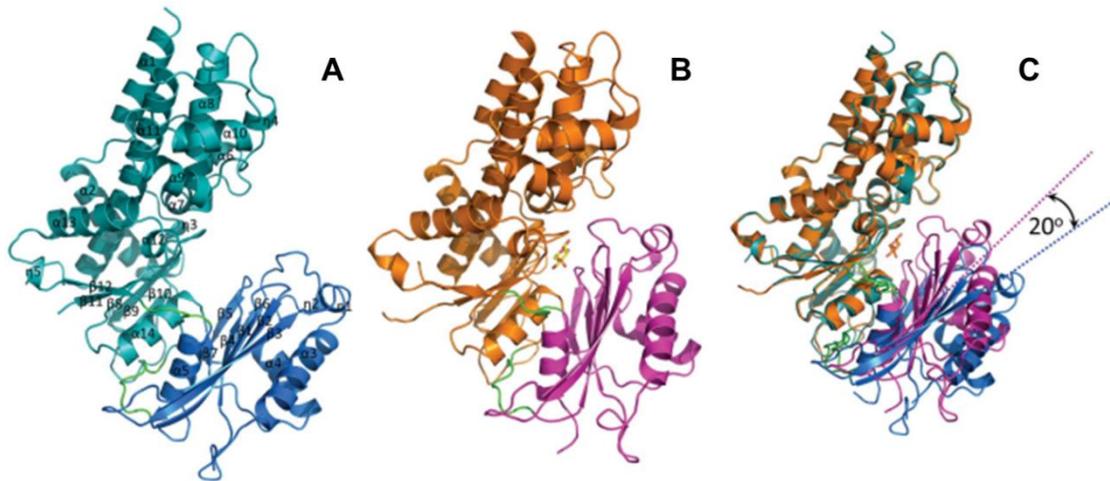
2-1 (que carecen de AtHXK1) se sugiere que las seis HXKs de maíz podrían tener actividad sensora.

### Estructura de las hexocinasas.

Las HXKs presentan una estructura formada por dos dominios, uno grande y otro pequeño, están conectados por una región de aminoácidos que constituyen un asa, formando una estructura tipo pinza. Esto le otorga a la proteína cierta flexibilidad. En la estructura de la HXK PII de *Saccharomyces cerevisiae*, se identificaron los aminoácidos relacionados con la unión de los sustratos y que se encuentran en la región tipo asa que une a los dominios grande y pequeño (Kuser et al., 2000).

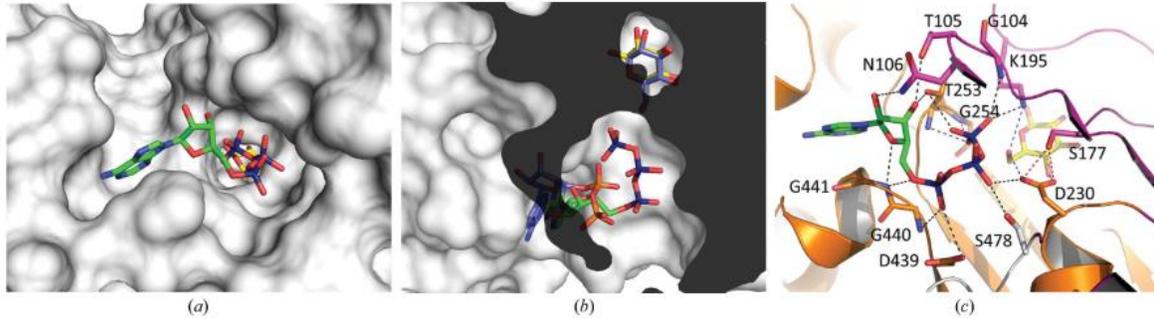
A la fecha solo dos estructuras de esta enzima de plantas han sido resueltas, AtHXK1 (PDB: 4QS7 y 4QS8) (Feng et al., 2015) a una resolución de 1.8 Å y OsHXK6 (PDB: 6JJ4 y 6JJ7) a una resolución de 2.6 Å (He et al., 2019).

Para AtHXK1, la enzima tiene 14 hélices- $\alpha$  estándar, 5 hélices- $3_{10}$  cortas y 12 hojas  $\beta$  y se pliega en dos dominios: uno grande de forma ovalada y uno pequeño con una arquitectura de tres capas, unidos por una región de bisagras flexibles (Figura 1A) (Feng et al., 2015). Los dominios se encuentran separados por una hendidura, en ausencia de Glu, AtHXK1 presenta una conformación abierta que favorece la unión de la Glu (Figura 1A). Al unirse la Glu, el dominio pequeño rota 20°, el mayor cambio conformacional ocurre en la región de las bisagras que unen a ambos dominios (Figura 1B y 1C).



**Figura 1.** Estructura cristalográfica de AtHXK1 libre y unida a sustrato. **(A)** AtHXK1 libre representada en forma de listones. **(B)** Estructura de AtHXK1 unida a Glu en una representación de listones. **(C)** Superposición de las versiones libre y unida a Glu. Modificado de Feng et al., 2015.

Dos aminoácidos conservados en todas las HXKs y asociados a la actividad catalítica de AtHXK1 son la G104 (Glicina 104) y la S177 (Serina 177), ambos participan en el proceso de transferencia del grupo fosfato del ATP hacia la hexosa (Figura 2). El residuo G104 tiene un papel fundamental en la formación de un puente de hidrógeno con el fosfato y del ATP, de hecho, experimentos en los que se produce la mutación G104D lleva a que el aspártico introducido choque con uno de los fosfatos del ATP previniendo la fosforilación de la hexosa (Wang et al., 2017). Por otra parte, el residuo S177 tiene una interacción indirecta con el ATP, ya que el átomo de oxígeno de su hidroxilo interactúa con el residuo D230 el cual tiene contactos con el ATP en el centro catalítico (Figura 2C; Feng et al., 2015). La mutación S177A en levadura ocasiona defectos en el crecimiento, y por su posición en el cristal se sugiere que produce una enzima sin capacidad de transferir el fosfato del ATP a la Glu (Kraakman et al., 1999; Moore et al., 2003; Feng et al., 2015).



**Figura 2.** Interacción de AtHXK1 con ATP y con glucosa. (a) Docking del ATP en la estructura de AtHXK1. (b) Interacción ADP-HsHXK (Hexocinasa 1 de humano). (c) Aminoácidos relacionados con la transferencia del grupo fosfato (Arora et al., 1993; Kraakman et al., 1999).

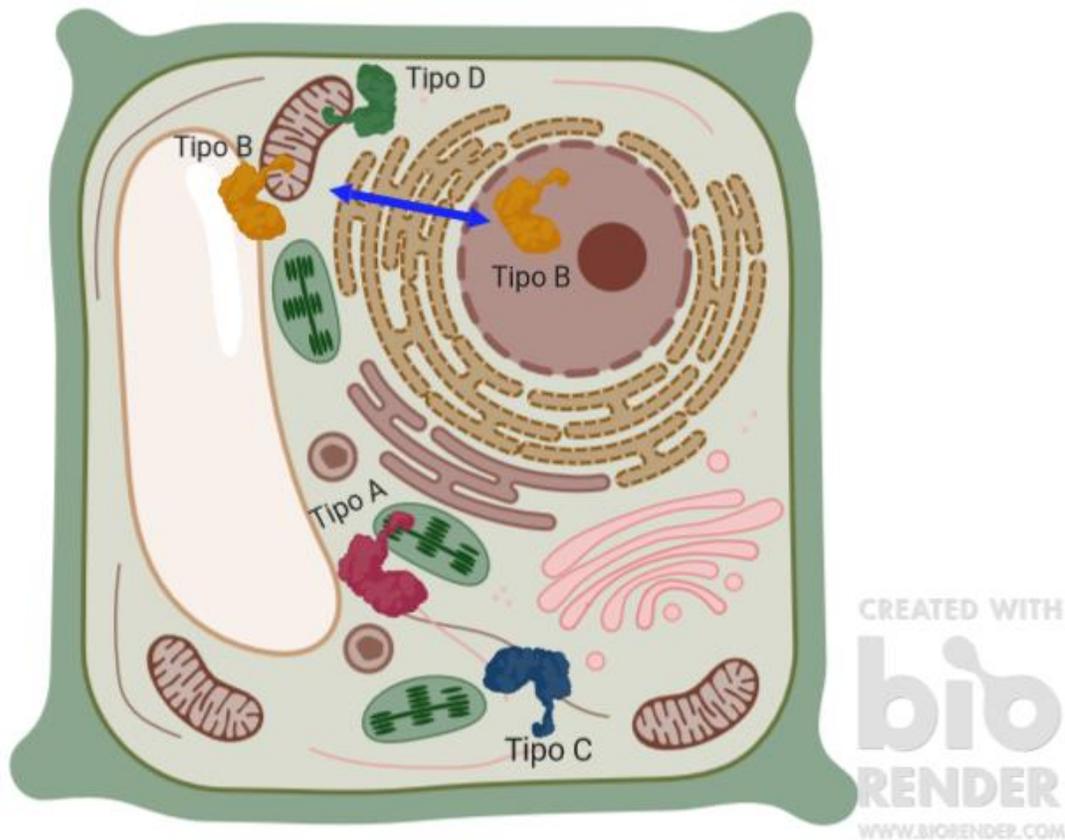
Durante la catálisis la molécula de glucosa se une primero al sitio activo de AtHXK1 y luego entra el ATP (Feng et al., 2015) por un mecanismo de unión de sustratos similar al descrito para HXK2 de *Saccharomyces cerevisiae* (Kuser et al., 2000). Este mecanismo es lo que permite que incluso las versiones no catalíticas de AtHXK1 (AtHXK1<sup>G104D</sup> y AtHXK1<sup>S177A</sup>) puedan percibir a la Glu (Feng et al., 2015), ya que la unión de la Glu induce el movimiento conformacional necesario para la señalización aun cuando ésta no sea fosforilada, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Moore et al. (2003) sobre la independencia entre la capacidad de funcionar como proteína sensora y la de fosforilar hexosas.

Wang et al. (2017) analizó mediante dicroísmo circular los cambios conformacionales de algunas variantes de OsHXK7, una HXK señalizadora de arroz (Kim et al., 2016). Las versiones no catalíticas OsHXK7-G76D y OsHXK7-S148A que se conoce no complementan la función señalizadora de Glu (Kim et al., 2016), no experimentan el movimiento conformacional requerido para la función señalizadora, opuesto a lo que muestran las versiones no catalíticas de *Arabidopsis*. En su modelo se observa que las asas en el bolsillo catalítico de OsHXK7-G76D y OsHXK7S148A no se mueven, lo cual sugiere que los residuos que la componen son importantes para la respuesta de señalización y explica por qué estas mutantes no complementan el fenotipo de las plantas carentes de la HXK sensora. Aún se

hace necesario determinar cuáles residuos del asa están implicados en el cambio conformacional requerido para la señalización. Lo anterior se podría demostrar produciendo mutantes en cada uno de los residuos que componen el asa, cristalizando a la enzima y llevando a cabo los experimentos de complementación en plantas para determinar si se pierde la capacidad de señalización.

### Localización subcelular de las hexocinasas en plantas.

La localización de las HXKs depende de su región amino-terminal. Con base en esta secuencia se clasifican en cuatro tipos (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017) (Figura 3).



**Figura 3.** Diagrama de la localización de los cuatro tipos de hexocinasas en plantas (A-D).

Las **HXK tipo A** contienen una secuencia de aproximadamente 30 aminoácidos en su región amino-terminal, misma que funciona como una señal de tránsito al cloroplasto. Se han encontrado HXKs tipo A en *A. thaliana*, *N. tabacum*, *O. sativa* y *V. vinífera*, entre otras plantas. En *A. thaliana*, AtHXK3 es cloroplástica y funciona como un sensor de glucosa que controla la expresión de uno de los genes que se encuentran en el complejo cosechador de la luz, *LHCB* (Zhang et al., 2010). Se ha propuesto que este tipo de HXKs tiene un papel importante en la producción de G6P para nutrir las vías de síntesis de almidón y ácidos grasos durante la noche, cuando la abundancia de carbohidratos es reducida (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017).

Las **HXKs tipo B** poseen en el extremo amino terminal un péptido de anclaje a la membrana externa de la mitocondria (mTP), conformado por una secuencia de aminoácidos altamente hidrofóbica. Algunas de estas proteínas tienen la capacidad de translocarse al núcleo debido a que poseen una secuencia de localización nuclear (NLS) adyacente al mTP (Cho et al., 2009). Estas HXKs son las más estudiadas y se han encontrado ligadas a diversos procesos celulares, teniendo en algunos casos actividad catalítica y una función como proteína sensora de la abundancia de glucosa (Cho et al., 2006b; Cho et al., 2009). Las HXKs tipo B se han encontrado involucradas en el control del proceso de muerte celular programada (PCD, Programmed Cell Death) y en la subsecuente producción de especies reactivas de oxígeno (Kim et al., 2006).

Las **HXKs tipo C** no poseen ningún péptido de unión a organelos, son citosólicas y no son inhibidas por ADP (Olsson et al., 2003). Se cree que participan en la formación de G6P a partir de la Glu exportada del cloroplasto (Nilsson et al., 2011). Recientemente se encontró que OsHXK7 tiene una función sensora (Kim et al., 2016).

Las **HXKs del tipo D** son proteínas asociadas a la mitocondria, encontradas en el musgo *Physcomitrella patens* pero poseen un péptido de anclaje a la mitocondria distinto a nivel de secuencia al de las tipo B debido a que contiene una sección de aminoácidos hidrofóbicos más pequeña (Nilsson et al., 2011).

A pesar de que las HXKs se pueden agrupar por su localización subcelular, esto no se puede relacionar con su función celular. Por ejemplo, se sugería que sólo las HXKs tipo B podían tener una función como proteínas sensoras debido a la capacidad de algunas de translocarse al núcleo (Cho et al., 2006b; Cho et al., 2009). Sin embargo, OsHXK7, a pesar de localizarse en el citoplasma también funciona como proteína sensora (Kim et al., 2016).

En la tabla 1 se colocan las principales hexocinasa de interés para este trabajo, junto con el tipo al que pertenecen y la localización subcelular que se ha comprobado.

#### Las otras funciones de la Hexocinasa.

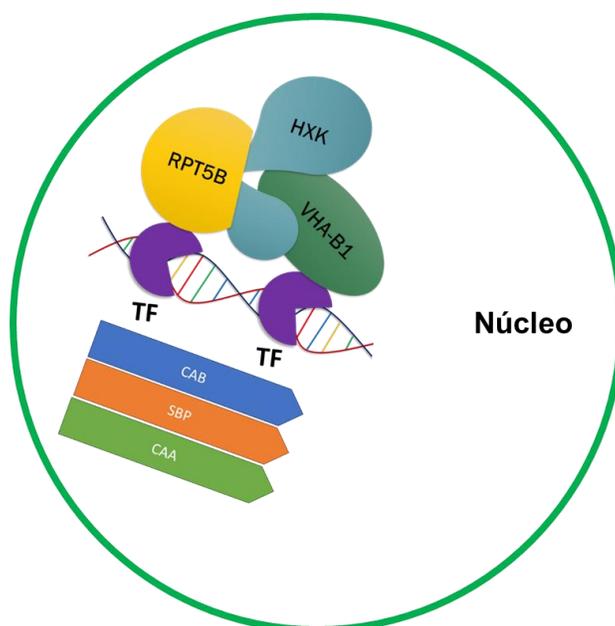
**La HXK es un sensor de la abundancia de azúcares.** Se ha demostrado que la represión de ciertos genes relacionados a la fotosíntesis como los de *CAB* (Proteína de unión a clorofila A/B), *CAA* (Anhidrasa carbónica) y *SBP* (Sedoheptulosa bifosfatasa) ocurre a través de una vía que depende de la HXK (Moore et al., 2003; Cho et al., 2006b).

Los ensayos farmacológicos con análogos de Glu y la producción de mutantes en la HXK han demostrado que el aumento en las concentraciones intracelulares de Glu son percibidas por la HXK y son transducidas como cambios en la expresión de genes (Koch et al., 1996; Jang et al., 1997; Price, 2003; Price et al., 2004; Villadsen y Smith, 2004).

AtHXK1 fue la primera HXK en la que se demostró la función de percibir la abundancia de glucosa y transducirla en la represión de varios genes fotosintéticos independientemente de su función como cinasa de azúcares (Moore et al., 2003). Las mutantes *gin 2-1* de *A. thaliana* con mutaciones en el gen que codifica para HXK1 y que hacen inestable al transcrito, son capaces de crecer en altas concentraciones (110-33 mM) de Glu. Estas mutantes presentan un fenotipo de insensibilidad a Glu que contrasta con el que presentan las plantas silvestres, las cuales detienen su crecimiento en estas condiciones (Moore, 2003). La complementación de las plantas *gin 2-1* con HXKs de otras especies vegetales junto

con el análisis de la expresión de varios genes fotosintéticos conforman la estrategia que ha permitido identificar a las HXKs sensoras. Si éstas restauran la sensibilidad a la glucosa y provocan la represión de genes *CAB*, *CAA* y *SBP* junto con el arresto del crecimiento en condiciones de alta concentración de glucosa, se considera que tienen la capacidad de ser sensoras. (Moore, 2003; Cho et al., 2006).

Así se identificaron HXK sensoras de la abundancia de Glu en *Arabidopsis* (Moore et al., 2003; Cho et al., 2006b), arroz (Cho et al., 2009), tomate (*Solanum lycopersicum*; Dai et al., 2002), uva (*V. vinífera*; Wang et al., 2014), tabaco (Kim et al., 2006), manzana (*Malus domestica*; Zhao et al., 2016), la planta de té (*Camellia sinensis*; Li et al., 2017) y maíz (Aguilera-Alvarado, 2019).



**Figura 4.** Complejo heterotrimérico conformado por AtHXK1 (HXK1 de *Arabidopsis thaliana*), RPT5B (Partícula 5B del proteosoma 26S) y VHA-B1 (Subunidad B1 de la ATPasa de protones vacuolar) que reprime la transcripción de genes fotosintéticos en el núcleo de la célula; *CAB*, Proteína de unión a clorofila A/B, *SBP*, Sedoheptulosa bifosfatasa, *CAA*, Anhidrasa carbónica, TF Factor de transcripción. Modificado de Cho et al., 2006.

El mecanismo de represión de la transcripción del gen *CAB2* (Proteína de unión a clorofila) se describió que ocurre a través de la formación de un complejo entre AtHXK1 con VHA-B1 (subunidad B1 de la ATPasa vacuolar) y RPT5B (partícula 5B del proteosoma 26S) en el núcleo. La interacción entre estas tres proteínas fue

demostrada mediante ensayos de inmunoprecipitación y la técnica de doble híbrido (Cho et al., 2006b). Sin embargo, las interacciones directas con AtHXK1 llevan a proponer la asociación entre proteínas que no tienen una relación directa entre sus funciones canónicas. Además, ninguna de ellas tiene la capacidad de interactuar directamente con el DNA. Cho y colaboradores (2006b) identificaron que VHA-B1 y RPT5B interactúan físicamente con dos factores transcripcionales que son los encargados de unirse al promotor de *CAB2*. El esquema propuesto sobre la composición y el mecanismo de este complejo se muestra en la figura 4.

Los dos factores de transcripción relacionados con el complejo represor son la “proteína 3 SCARECROW-like” (At1g50420) y un factor transcripcional de la familia myb (At3g11280) (Cho et al., 2006b; datos suplementarios). Aunque no hay evidencia experimental de las funciones de ambas proteínas, pese su unión al complejo trimérico, se infiere su función debido a la similitud de secuencias y patrones de expresión con proteínas que ya han sido estudiadas. La proteína 3 SCARECROW-LIKE se une a proteínas con motivos dedos de zinc y los genes que regula están relacionados con la respuesta a la fitohormona ácido giberélico (GA) (Yoshida et al., 2014), MYB está relacionada con la regulación de la vía de señalización por GA y en la del ácido salicílico, otra fitohormona (Dubos et al., 2010).

Hasta el momento hay muchas interrogantes respecto al complejo de HXK con VHA-B1 y RPT5B, como: ¿Cuáles son los sitios de contacto entre AtHXK1 y sus insospechados compañeros?, ¿Cuál es el mecanismo que lleva a las tres proteínas al núcleo?, ¿Hay otros genes, además de los fotosintéticos que son regulados por este complejo?, ¿Por qué la HXK mitocondrial es la que se dirige al núcleo y no la citosólica?

**Tabla 1. Localización y tipo de las Hexocinasas de arroz, maíz y *Arabidopsis*.**

Hexocinasa	Tipo	Localización
AtHXK1	B	Mitocondria y núcleo
OsHXK5	B	Mitocondria y núcleo
OsHXK6	B	Mitocondria y núcleo
OsHXK7	C	Citosol
ZmHXK4	B	Mitocondria
ZmHXK5	B	Mitocondria
ZmHXK6	B	Mitocondria
ZmHXK7	C	Citosol
ZmHXK8	C	Citosol
ZmHXK9	B	Mitocondria

La HXK también tiene la capacidad de unirse a otras proteínas, como el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), asociación que le permite utilizar el ATP que proviene de la fosforilación oxidativa en el interior de la mitocondria para fosforilar a la Glu mediante un mecanismo de “channeling”. Además esta interacción permite el reciclaje de ADP al interior de la mitocondria, lo que supone un proceso metabólico más eficiente (Alcántar-aguirre et al., 2013). La interacción HXK-VDAC está conservada también en mamíferos (Pastorino y Hoek, 2008) y se propone que esta interacción entre VDAC y la HXK tipo II de humano optimiza la fosforilación de Glu y permite a la HXK ser un sensor del nivel energético del organelo (Wilson, 2003). Aunque se desconoce cuáles son los residuos que están en contacto entre ambas proteínas, se especula que lo hacen a través de sus regiones embebidas en la membrana. Sin embargo, una HXK de maíz (ZmHXK4 $\Delta$ 30) que carece de la mTTP es capaz de interactuar con VDAC proveniente de mitocondrias aisladas (King-Díaz, comunicación personal). Es probable que en plantas la asociación de la HXK a la mitocondria también le permita conectar al organelo productor de energía con la abundancia de azúcares en el citoplasma y su movilidad al núcleo puede llevar a la respuesta celular.

En humanos se demostró mediante ensayos de localización subcelular con microscopía confocal que la hexocinasa tipo IV (glucocinasa; GK), puede translocarse al núcleo. En condiciones de baja concentración de glucosa, la GK de las células pancreáticas es secuestrada en el núcleo por la proteína reguladora de la GK (GKRP), proceso reversible que ocurre al aumentar los niveles de glucosa o fructosa (Brown et al., 1997). Por lo que no es sorprendente que una HXK de plantas también se transloque al núcleo, aunque en el caso de las plantas, la formación del complejo heterotrimérico le permite no solo ser sensor sino también participar en la represión de genes de una manera más directa, al menos como se ha demostrado para el gen *CAB2* (Cho et al., 2006b).

### **La HXK de manzana es una cinasa de proteínas.**

Recientemente se demostró una actividad adicional para la hexocinasa: la capacidad de fosforilar proteínas. MdHXK1 (Hexocinasa 1 de *Malus domestica*) fosforila a dos proteínas, al factor transcripcional MdHLBL3 relacionado con la vía de biosíntesis de antocianinas (Zhao et al., 2016; Hu et al., 2016) y al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  vacuolar, involucrado en las respuestas al estrés por salinidad en la planta (Sun et al., 2018).

El aumento en la concentración de Glu lleva a la acumulación de antocianinas en muchas plantas, y en callos de manzana transformados con las versiones sobreexpresoras de MdHXK1 se observa una alta acumulación de antocianinas. Hu et al. (2016) demostraron que la HXK interacciona con el factor transcripcional MdbHLH3 fosforilándolo en la Ser<sup>361</sup>. *In vivo*, la expresión de MdbHLH3 con la mutación Ser<sup>361</sup>A reduce la cantidad de antocianinas en el callo, sugerente de que su fosforilación por la HXK es un paso importante en la acumulación de antocianinas en respuesta a los niveles de Glu.

Por otra parte, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación junto con experimentos de doble híbrido, demostraron que el dominio 2 de MdHXK1 interactúa físicamente con el factor transcripcional MdbHLH3 (Hu et al., 2016).

En otro reporte del mismo grupo, se encontró que el antiportador MdNHX1 también es fosforilado en una Serina (Ser<sup>275</sup>). Lo anterior sugiere que al menos la HXK1 de manzana tiene cierta preferencia para llevar a cabo la fosforilación en proteínas con serinas fosforilables expuestas, lo que incorpora a un gran grupo de proteínas que pueden funcionar como sustratos de la enzima (Sun et al., 2018). La sobreexpresión de MdHXK1 en callos de manzana provoca la acumulación de sodio en vacuolas al someterlas a un tratamiento con altas concentraciones de Glu. La activación del antiportador se debe a su fosforilación por la HXK y permite que la planta sobreviva a altas concentraciones de NaCl (Sun et al., 2018).

### Mecanismos de transporte de proteínas hacia el núcleo.

La translocación de proteínas al núcleo ocurre a través del poro nuclear, el cual gracias a sus dimensiones permite el libre paso de iones, algunos metabolitos y moléculas de peso molecular menor de 40 kDa. Sin embargo, no se permite la libre difusión de muchas proteínas, aún las proteínas con peso molecular pequeño deben ser transportadas mediante un mecanismo especializado, todavía desconocido. Aquellas proteínas que tienen destino nuclear muchas veces presentan una señal de localización nuclear o NLS (Kriwacki y Yoon, 2011).

Las NLS están conformadas por uno o más clúster de aminoácidos básicos repetidos (Gorlich, 1997), de acuerdo con el patrón de distribución de estos aminoácidos, las NLS pueden ser clasificadas como monopartitas y bipartitas, siendo las primeras las que están compuestas por un solo clúster de aminoácidos básicos y las segundas las que poseen dos clúster separados por 10 a 12 aminoácidos que no pertenecen a la NLS (Kosugi et al., 2009; Marfori et al., 2011).

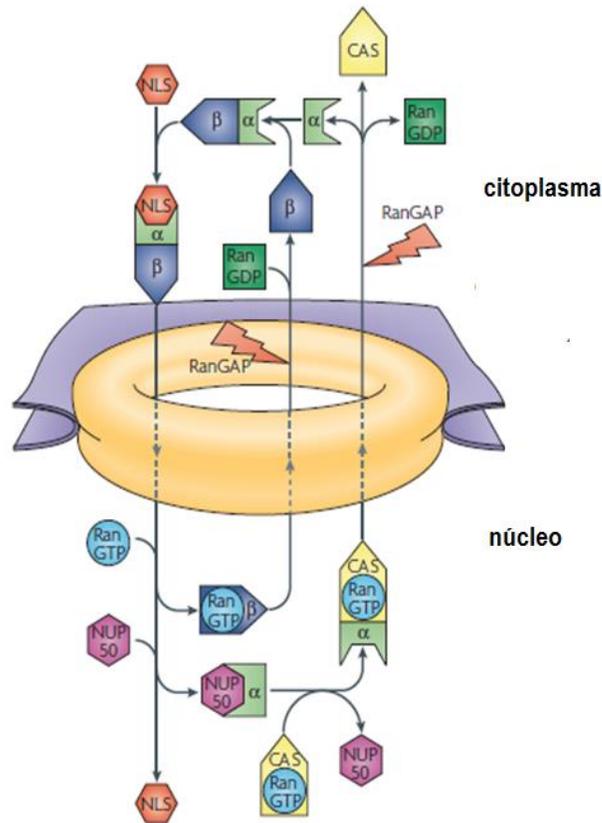
El mecanismo mejor conocido para la translocación de proteínas al núcleo es el mediado por importinas. El reconocimiento de la NLS por el heterodímero  $\alpha$ - $\beta$  de la importina, ocurre específicamente en la subunidad  $\alpha$ , que se considera como una “proteína adaptadora” para la NLS (Figura 5). La importina  $\alpha$  está compuesta por dos dominios estructurales y funcionalmente distintos: su dominio N-terminal de

unión a Imp $\beta$ 1 ( $\alpha$ IBB) y su dominio carboxilo terminal que consiste en 10 repetidos Armadillo (Arm) en tándem, la repetición de los dominios Arm genera una estructura superhelicoidal. La NLS es reconocida por una serie de residuos de triptófano y una asparagina muy conservados en esta región superhelicoidal, que se puede dividir en dos surcos, uno mayor (compuesto por los residuos de las repeticiones Arm 2-4) y uno menor (formado por los residuos de las repeticiones Arm 6-8). Así, las NLS bipartitas se unen a sitios de unión en ambos surcos de manera que se favorezcan las interacciones con residuos de asparagina, principalmente. En tanto que las NLS monopartitas se unen de manera análoga a cualquiera de los dos surcos, aunque el surco más grande se considera como el de mayor afinidad por las NLS de este tipo (Fontes et al., 2000).

Imp $\beta$ 1 es una enzima esencial para el transporte entre el núcleo y el citoplasma. Estructuralmente tiene una forma solenoide y está compuesta por 19 repetidos HEAT en tándem plegados formando una superhélice, ésta amplia superficie de contacto le permite a Imp $\beta$ 1 interactuar con diversas proteínas como son la proteína adaptadora Imp $\alpha$  (Mitrousis et al., 2008), Ran (Lee et al., 2005) y Nups (Liu et al., 2015).

La primera interacción de interés para las proteínas con destino nuclear que poseen una NLS funcional es la que tienen con Imp $\alpha$  y que está mediada por la interacción entre el dominio amino terminal con el  $\alpha$ IBB formado por aproximadamente 40 residuos altamente conservados. La gran afinidad que presenta Imp $\beta$ 1 por este dominio se debe a que mediante interacciones de sus repeticiones HEAT rodea al extremo amino terminal cubriendo más del 40 % de su superficie (Marfori et al., 2011).

Una vez que Imp $\beta$ 1 se ha unido a la proteína adaptadora de la NLS, ésta interactúa con el complejo del poro nuclear ('NPC' por sus siglas en inglés) y lleva a cabo la translocación (Figura 5), donde Imp $\beta$ 1 se asociará a las proteínas Ran y Nup2 lo que produce la disociación del complejo Imp $\beta$ 1-Imp $\alpha$  y el retorno de estas últimas proteínas hacia el citoplasma (Kriwacki y Yoon, 2011).



**Figura 5.** Mecanismo de importe de proteínas al núcleo mediado por NLS.

El complejo de importación al núcleo se forma en el citoplasma entre las proteínas acarreadoras (importinas  $\alpha$  y  $\beta$ ) movilizándolo a una proteína que posee un NLS. Al pasar por el complejo del poro nuclear, RanGTP y NUP50 rompen la interacción de la proteína con destino nuclear y las proteínas acarreadoras promoviendo el transporte de las últimas hacia el citoplasma. Modificado de Stewart, 2007. NLS, Nuclear Localization Signal; Ran GTP, proteína nuclear relacionada a Ras activada con GTP; Nup50, Nucleoporina 50; CAS,  $\beta$ -carioferina; RanGAP, proteína activadora de Ran GTPasa;  $\alpha$ , subunidad  $\alpha$  de la importina;  $\beta$ , subunidad  $\beta$  de la importina.

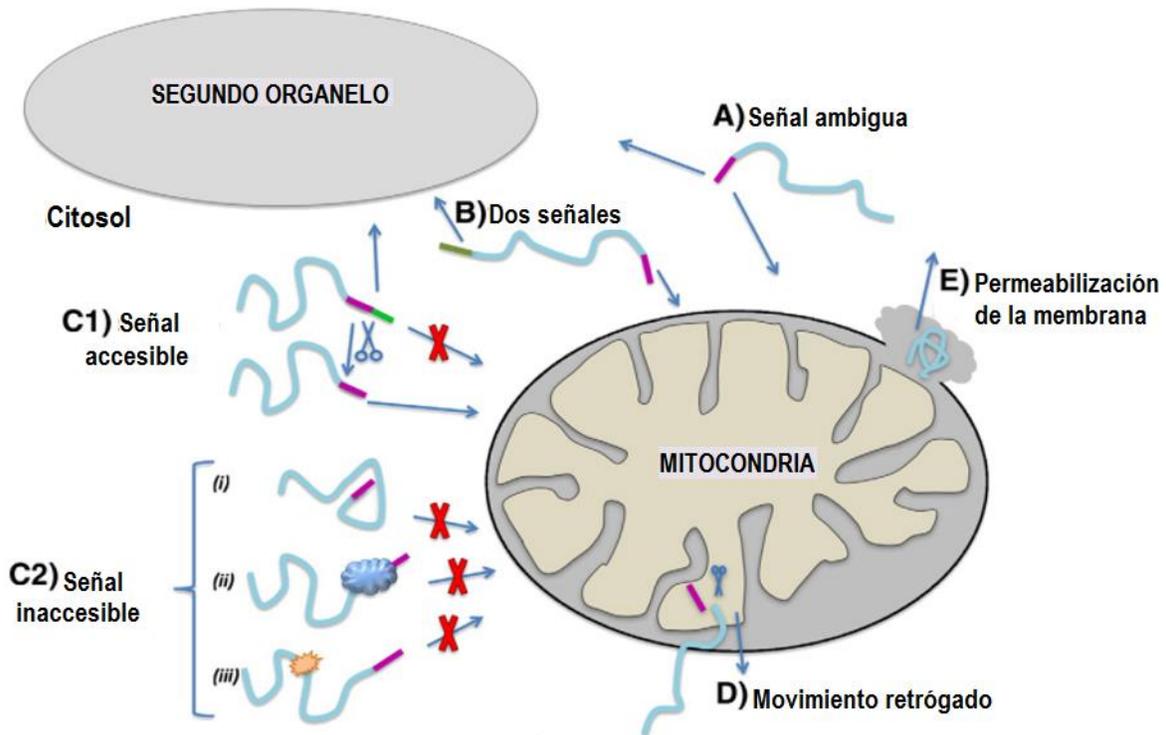
### Proteínas con doble blanco subcelular.

Hay proteínas que tienen una localización dual, como algunas HXKs tipo B, que se translocan entre la mitocondria y el núcleo (Moore, 2003; Cho et al., 2006; Cho et al., 2009). Los mecanismos por los cuales las proteínas pueden presentar dos localizaciones distintas son muy variados, pero básicamente se pueden dividir en los siguientes (Figura 6):

1. **Señal ambigua:** Proteínas que poseen una sola secuencia de localización que puede presentar afinidad por dos organelos y ocurre una competencia entre éstos por la señal. Así la localización de la proteína será determinada por la afinidad que presenten los receptores de los organelos por la señal de localización (Figura 6A).  
Hay reportes de este fenómeno de competencia entre la mitocondria y el cloroplasto debido a la similitud de las secuencias de localización para ambos organelos (Carrie et al., 2009).
2. **Dos o más señales de localización:** La proteína posee dos péptidos que funcionan como señales de localización para organelos específicos, donde para determinar la localización subcelular predominará la señal que tenga mayor afinidad por su organelo blanco (Regev-Rudzki et al., 2008) (Figura 6B).
3. **Accesibilidad de señales:** Para que una proteína pueda usar su péptido señal se requiere que esta secuencia sea accesible. Algunas proteínas pueden, bajo ciertas condiciones volver inaccesible a la señal y de esta manera evitar la asociación con los receptores de algún organelo blanco (Naamati et al., 2009). O, por lo contrario, que bajo ciertas condiciones ambientales la señal se vuelva accesible (Figura 6C1). La inaccesibilidad de las señales puede ser dada por diferentes razones (Figura 6C2), como cambios en el plegamiento de la proteína, interacción con otras proteínas y modificación de la cadena polipeptídica.
4. **Translocación reversa:** Este mecanismo (Figura 6D) se ha encontrado en la enzima fumarasa de *S. cerevisiae*, una proteína de destino mitocondrial pero que también se ha encontrado en el citoplasma. Esto se debe al plegamiento de la proteína, si éste comienza en el citoplasma, la proteína se mantendrá en este lugar. Sin embargo, si el plegamiento se da en la

mitocondria, la enzima tendrá una localización mitocondrial (Sass et al., 2003).

5. **Permeabilización de la membrana, liberación o exportación de proteínas:** El mecanismo aún no se ha caracterizado completamente, sin embargo, se usa para describir a proteínas de localización mitocondrial que salen de este organelo. Se cree que se debe a condiciones de estrés, que dañan la membrana mitocondrial y permiten la liberación inespecífica de proteínas (Brenner y Mak, 2009) (Figura 6E).



**Figura 6.** Diferentes mecanismos por los cuales una proteína puede poseer más de un blanco subcelular. Modificado de (Yogev y Pines, 2011).

Las hexocinasas de plantas tipo B, que normalmente poseen una función sensora de represión de genes fotosintéticos en condiciones de alta concentración de glucosa; se han encontrado ancladas a la membrana externa mitocondrial y en el núcleo, dónde forma un complejo represor de la transcripción de genes. Sin embargo, el mecanismo de traslocación de estas proteínas se desconoce, al igual que el papel que el extremo amino terminal podría desempeñar en él.

## Justificación

Las HXKs son enzimas que tienen la capacidad de percibir y transducir la señal de la abundancia de Glu, lo que lleva a regular la expresión de una gran variedad de genes. Ante la abundancia de Glu la HXK reprime algunos genes fotosintéticos, entre ellos *CAB2*. Para este gene en particular se encontró que la represión ocurre tras la formación de un complejo heterotrimérico en el que la HXK se encuentra involucrada (Cho et al., 2009). El transporte de las tres proteínas que forman el complejo al núcleo se desconoce. Sin embargo, mediante ensayos de localización subcelular utilizando protoplastos de *A. thaliana* y *O. sativa* se demostró que la remoción de una sección de la región N-terminal de algunas HXKs mitocondriales puede cambiar su localización de la mitocondria al núcleo (Moore et al., 2003; Cho et al., 2006b). En el extremo N-terminal de las hexocinasas OsHXK5 y OsHXK6 se encontró a la mTP seguida de una secuencia NLS. La remoción de la mTP provocó la translocación de estas proteínas hacia el núcleo. Lo que supone que estas proteínas podrían formar el complejo represor en el núcleo como lo hace AtHXK1 (Cho et al., 2006b).

En maíz, la forma ZmHXK6 $\Delta$ 30 es soluble, activa catalíticamente y pierde su localización mitocondrial en protoplastos de *Arabidopsis* formando agregados en el citoplasma, que podrían corresponder a la proteína en el núcleo (Aguilera-Alvarado et al., 2019). Adicionalmente, en ensayos de interacción proteína-proteína mediante “pull down” usando como carnada a ZmHXK6 $\Delta$ 30 y extractos de coleóptilos de maíz de 72 h, se identificaron a varias proteínas como posibles interactores, entre ellas VHA-B1 (King-Díaz, comunicación personal), una de las proteínas del complejo represor.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si ZmHXK6 posee la capacidad de translocarse al núcleo, así como identificar la región de su secuencia que es responsable de esto y observar qué efectos *in planta* ocasiona la sobreexpresión de una HXK sin la capacidad de anclarse a la mitocondria.

## **Hipótesis**

Una modificación en la región del dominio amino terminal de ZmHXK6 provocará un cambio en su localización dentro de la célula, de la mitocondria hacia el núcleo sin afectar su funcionalidad *in planta*.

## Objetivo

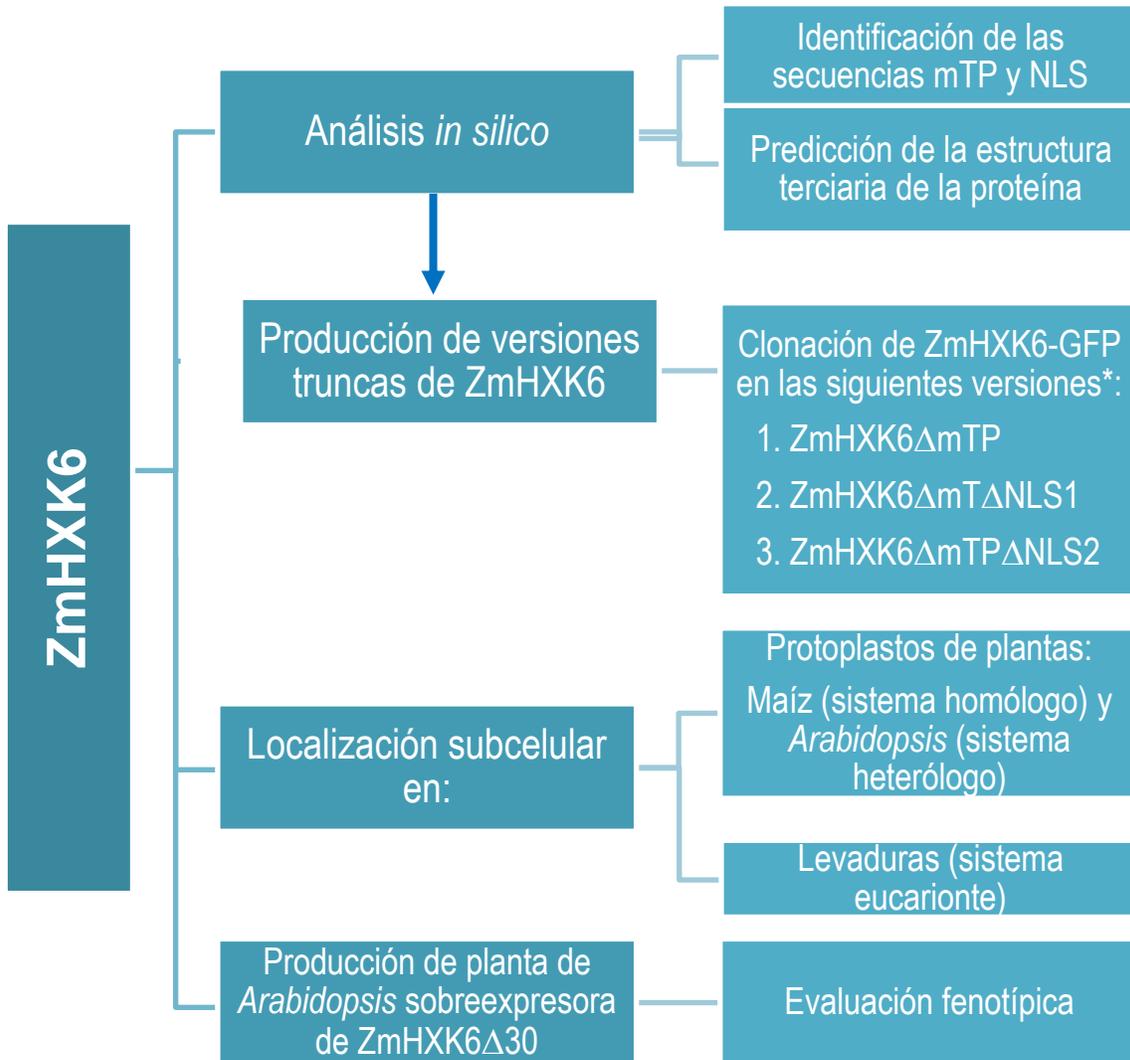
Establecer la función de la región N-terminal de ZmHXK6 sobre su localización subcelular y que secuencias son esenciales para la translocación de la proteína, así como comprobar que su versión trunca es funcional in planta.

### Objetivos particulares

1. Comprobar que ZmHXK6 $\Delta$ 30 tiene una localización nuclear.
2. Identificar la región del extremo amino terminal necesaria para que la NLS sea funcional.
3. Determinar la localización subcelular de diferentes versiones truncas de ZmHXK6.
4. Determinar la localización subcelular de la versión ZmHXK6 $\Delta$ 30 en levadura.
5. Probar la funcionalidad de ZmHXK6 $\Delta$ 30 al sobreexpresarla en *Arabidopsis*.

## Desarrollo experimental

Para cumplir los objetivos del trabajo se siguió el esquema experimental que se muestra en la figura 7. Se inició el trabajo con la identificación *in silico* de la NLS de las ZmHXKs, para a partir de esa predicción producir las versiones truncas sin mTP y con o sin NLS, todas unidas a GFP para realizar los ensayos de localización. De manera adicional, se produjeron plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan a ZmHXK6 $\Delta$ 30 para estudiar su fenotipo.



**Figura 7.** Esquema general de desarrollo experimental. \*ZmHXK6 presentó dos cluster de NLS, por lo cual se produjeron versiones sin el primer cluster o sin dos cluster de NLS.

## Materiales y métodos

### Análisis *in silico* de las HXKs.

**Identificación de las secuencias de localización nuclear en las HXKs de maíz.** Para determinar la presencia de secuencias de localización nuclear (NLS) se utilizaron dos recursos bioinformáticos disponibles en línea: NucPred (Stockholm Bioinformatics Center (<http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/cgi-bin/single.cgi>), NLS Nostradamus (<http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/>) y LOCALIZER (<http://localizer.csiro.au/>). Se introdujeron las secuencias de las 9 diferentes HXKs de *Zea mays*, así como de proteínas de conocida función nuclear como HXK1 de *A. thaliana*, OsHXK5 y OsHXK6 de *O. sativa*. También se incluyó la secuencia de la HXK2 de *S. cerevisiae* como grupo externo.

**Predicción de la estructura terciaria de las hexocinasas mitocondriales de maíz.** Para la predicción de la estructura de las hexocinasas se utilizó el servidor I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) de la Universidad de Michigan (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Como se querían comparar no solo las estructuras completas sino en particular las regiones N-terminal de cada proteína, se utilizó el programa mencionado ya que permite predecir la estructura sin compararlo necesariamente con un homólogo depositado en PDB (Protein Data Bank). Los números de acceso de las secuencias analizadas se encuentran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Número de acceso de las HXKs analizadas y comparadas en este trabajo.

<b>Organismo</b>	<b>Nombre de la HXK</b>	<b>Número de acceso</b>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtHXK1	AT4G29130.1
<i>Malus domestica</i>	MdHXK1	A0A068EPI9
<i>Zea mays</i>	ZmHXK4	GRMZM2G058745
<i>Zea mays</i>	ZmHXK5	GRMZM2G467069
<i>Zea mays</i>	ZmHXK6	GRMZM5G856653
<i>Zea mays</i>	ZmHXK9	GRMZM2G171373

Las secuencias fueron tomadas de UniprotKB y Maize GDB.

### Producción de versiones truncas de ZmHXK6.

La estrategia de producción de estas proteínas fue mediante la introducción de las secuencias codificantes en el vector de expresión de plantas, pEarley Gate 103, mediante la tecnología de clonación Gateway®. Para observar su localización subcelular, todas las versiones se produjeron fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP).

#### *Amplificación de las secuencias mediante PCR.*

En el laboratorio ya se contaba con la clona para la expresión de la versión completa de ZmHXK6, pDONR 221-ZmHXK6, la cual ya fue secuenciada (Aguilera-Alvarado et al., 2019), por lo que el plásmido fue usado como templado para llevar a cabo la producción de las versiones truncas mediante una amplificación selectiva por PCR. Se diseñaron los oligonucleótidos en el programa Snapgene®. En el anexo I se muestran las secuencias de los oligonucleótidos que se diseñaron para producir las tres versiones de ZmHXK6 con deleciones, y que fueron:

**Tabla 3.** Características de las construcciones obtenidas.

<b>Nombre de la construcción</b>	<b>Características de la secuencia</b>	<b>Localización esperada</b>
$\Delta$ mTP	Delección de la secuencia del mTP, Corresponde a un $\Delta$ 28.	Nuclear
$\Delta$ NLS1	Delección de la secuencia del mTP y el primer cluster de argininas del NLS. Corresponde a un $\Delta$ 33.	Nuclear
$\Delta$ NLS2	Delección de la secuencia del mTP y la NLS completa. Corresponde a un $\Delta$ 46.	Citoplásmica

La secuencia de los primers utilizados se encuentra en el anexo I, la parte de la secuencia subrayada corresponde a la secuencia necesaria para llevar a cabo la segunda PCR con unos oligonucleótidos adaptadores (attB1 y attB2).

Las reacciones de PCR se realizaron según se presenta en la figura 7 y las condiciones de la reacción para producir todas las versiones truncas fueron las mismas y se muestran en la tabla 4. El programa de temperatura que se siguió para la reacción de amplificación fue una desnaturalización inicial a 98 °C por 2 min, seguida por 33 ciclos de: desnaturalización de 98 °C a 10 s, alineamiento 55 °C por 5 s y extensión 72 °C por 2 min. Al final se realizó una extensión final a 72 °C por 10 min.

**Tabla 4.** Reactivos para la amplificación por PCR.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
<b>Advantage Taq Polymerase</b>	0.25 µL
<b>5X Advantage Buffer</b>	5 µL
<b>dNTPs mix (2.5 mM)</b>	2 µL
<b>Templado (50 ng/µL)</b>	1 µL
<b>Mezcla de oligonucleótidos (10 mM)</b>	0.5 µL
<b>Agua libre de nucleasas</b>	16.25 µL

*Electroforesis en gel de agarosa al 0.7%.*

Los amplicones resultantes de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello se utilizó un gel de agarosa al 0.7 % adicionado con bromuro de etidio a una concentración final de 0.0625 µg/mL. Los ácidos nucleicos se separaron al aplicar un voltaje de 85 V/ 35 min en una cámara de electroforesis con amortiguador TAE 1X. Una vez terminado este tiempo se analizaron los resultados en un transiluminador WiseUv® mod. WUV-L50.

*Recuperación del DNA de los fragmentos de agarosa.*

Para llevar a cabo este proceso se utilizó el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery siguiendo las instrucciones del fabricante.

*Inserción de los amplicones en el vector de entrada pDONR 221.*

Los amplicones recuperados del gel se colocaron en una reacción BP, siguiendo las instrucciones del proveedor, colocando en un tubo de PCR los volúmenes de reacción indicados en la tabla 5.

**Tabla 5.** Volúmenes de reacción BP.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µL)</b>
<b>Pdto de PCR (+attB)</b>	≤ 250 ηg
<b>pDONR 221</b>	150 ηg
<b>Buffer BP 5X</b>	2
<b>BP Clonasa</b>	2
<b>Buffer TE hasta completar 10 µL</b>	

La reacción se incubó a temperatura ambiente toda la noche, luego se añadieron 2 µL de Proteinasa K y se incubó a 37 °C por 10 min previoamente a la transformación de bacterias *E. coli* DH5α.

*Reacciones de recombinación para insertar el transgene en el vector de expresión en planta.*

A partir de la construcción que se tenía en pDONR 221 de la hexocinasa 6 de maíz (Aguilera-Alvarado et al., 2019) y sus versiones trucas se realizó la reacción de recombinación por la tecnología Gateway® hacia el plásmido pEarley Gate 103 (para expresión en plantas). La reacción LR sirve para transferir el inserto de un plásmido de mantenimiento o vector donador (pDONR 221) a uno de expresión (pEarley Gate 103). Las cantidades de los reactivos para cada reacción LR se resumen en la tabla 6.

**Tabla 6.** Cantidad de reactivos para la reacción LR.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (µL)</b>
<b>Clona de entrada</b>	100-300 ng
<b>Vector destino (pEarleyGate 103)</b>	300 ng
<b>Buffer LR Clonasa 5X</b>	2
<b>Buffer TE hasta completar 8 µL</b>	

La enzima LR Clonasa se almacena a -80 °C y antes de la reacción se colocó en hielo por 2 min, después se agitó en vórtex por 2 s y se añadieron 2 µL de la enzima a cada reacción. Al igual que la reacción BP se incubó a temperatura ambiente toda la noche, después se le añadieron 2 µL de proteinasa K y se incubó a 37 °C por 10 min. La reacción se utilizó para transformar *E. coli* DH5α.

*Transformación de E. coli DH5α con las construcciones.*

Se llevó a cabo una transformación por choque térmico, utilizando células competentes de *E. coli* DH5α. Para ello se incubaron 50 µL de células competentes con 100 ng de plásmido durante 30 min en hielo. Luego se dio un choque térmico a 42 °C por 45 s en un bloque de calentamiento, inmediatamente después se colocó en hielo por 10 min.

Para permitir la recuperación de las células se les añadió 900 µL de medio SOC (2% Triptona, 0.5% Extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Glucosa) y se incubaron por 90 min a 37 °C en agitación a 200 rpm. Después se centrifugaron a 4000 rpm por 4 min, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 100 µL de medio LB, el cual se plaqueó en las cajas con el antibiótico adecuado para la selección de las cepas transformantes.

*Extracción y purificación de los vectores que codifican para ZmHXK6 y sus versiones truncas de las cepas de E. coli.*

La purificación se llevó a cabo con 50 mL de células de un cultivo crecido toda la noche (16 h/ 37 °C/ 250 rpm) utilizando el kit Zippy™ Plasmid Midiprep de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los vectores purificados fueron cuantificados en el Nanodrop 2000 (ThermoScientific®) y usados para la transfección de levadura o los protoplastos de *Arabidopsis* y maíz.

*Obtención del vector pAG426GPD-ccdB-EGFP-ZmHXK6 y ZmHXK6 $\Delta$ 30 para la expresión en levadura.*

A partir de la construcción que se tenía en pDONR 221 de la hexocinasa 6 de maíz y su versión  $\Delta$ 30 se realizó la reacción de recombinación por la tecnología Gateway® con el plásmido pAG426GPD-ccdB-EGFP, la reacción LR es útil para transferir el inserto de un plásmido de mantenimiento (pDONR 221) a uno de expresión. pAG426GPD-ccdB-EGFP se obtuvo de Addgene (producida por Susan Lindquist; Addgene plasmid # 14204; <http://n2t.net/addgene:14204>; RRID:Addgene\_14204). En la Tabla 7 se muestran los reactivos y las cantidades necesarias para llevar a cabo la reacción LR.

**Tabla 7.** Cantidades de reactivos para llevar a cabo la reacción LR.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b>
<b>Clona de entrada</b>	100-300 ng
<b>Vector destino</b>	300 ng
<b>Buffer LR Clonasa 5X</b>	2
<b>Buffer TE hasta completar 8 <math>\mu</math>L</b>	

La enzima LR Clonasa se almacena a -80 °C. Antes de la reacción se colocó en hielo por 2 min, después se agitó en vórtex por 2 s y se añadió 2  $\mu$ L de la enzima a cada reacción junto con los componentes que se listan en la tabla 7. Al igual que la reacción BP se incubó a temperatura ambiente toda la noche, después se le

añadieron 2  $\mu$ L de proteinasa K y se incubó a 37 °C por 10 min. La mezcla de reacción se utilizó para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$ .

### Localización subcelular de HXKs en protoplastos de plantas

Se utilizó un sistema de expresión transitoria de las HXKs en protoplastos de *A. thaliana*. Para localizar a las HXKs se requirió de dos pasos, primero el aislamiento de protoplastos de *A. thaliana* seguido de su transfección con las diferentes versiones de HXKs.

*Aislamiento de protoplastos (Yoo, Cho, y Sheen, 2007).*

1. Se sembraron semillas de *A. thaliana* en maceta con sustrato SunShine, con fotoperiodo natural y riego cada tres días, solo para evitar que se secase el sustrato.
2. Solo se utilizaron plantas de *A. thaliana* con crecimiento de entre 3 y 4 semanas, completamente sanas y que no hubieran florecido. Se utilizaron los terceros y cuartos pares de hojas y se cortaron con una navaja. Sobre una caja Petri se colocaron las hojas y se cortaron con una navaja haciendo cortes transversales entre 0.5 y 1 mm, empleando solamente la región media de la hoja.
3. Inmediatamente después se adicionó a la caja Petri con las tiras de hoja una solución de enzimas digestivas de pared celular recién preparada (Celulasa R10 1.5%, Macerozima R10 0.4%, Manitol 0.4 M, KCl 20 mM, MES 20 mM pH= 5.7, CaCl<sub>2</sub> 10 mM). Con ayuda de unas pinzas delgadas se sumergieron las tiras, teniendo cuidado de que estuvieran totalmente cubiertas con la solución.
4. Se colocó la caja Petri sin tapar dentro de un desecador. Se cubrió el desecador con papel aluminio para cubrir de la luz y se aplicó vacío por 25 min a temperatura ambiente.

5. Al terminar el tiempo de incubación se quitó el vacío, la caja Petri fue tapada y luego cubierta con papel aluminio para después ser colocada en una incubadora para continuar la digestión durante 90 min con agitación suave (40 rpm) a 25 °C. Para facilitar la liberación de los protoplastos se realizó una agitación final a 80 rpm por 5 min.
6. Para recuperar los 15 mL con protoplastos se agregaron a la caja con las tiras de hojas 15 mL de la solución W5 (NaCl 154 mM, CaCl<sub>2</sub> 125 mM, KCl 5mM, MES 2 mM, pH=5.7) y la solución se filtró a través de una malla de nylon de 37-75 µm (previamente humedecida con solución W5), el filtrado se colocó en un tubo de plástico de centrifuga sin tapa.
7. Se centrifugó a 200 x g, 2 min, 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en el menor volumen posible de solución W5.
8. Con ayuda de un microscopio se verificó la integridad de los protoplastos y de encontrarse en buenas condiciones, es decir células redondas y pocos organelos y restos celulares fuera de los protoplastos, se realizó el conteo con un hematocitómetro. Normalmente de 1 planta que posee entre 10-15 hojas se obtienen entre 5-7 x 10<sup>5</sup> protoplastos/mL.
9. Se ajustó el volumen de los protoplastos con la solución W5 para tener 2 x 10<sup>5</sup> protoplastos/mL.
10. Se centrifugó a 200 x g, 2 min, 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en el mismo volumen anterior de solución W5, necesario para tener 2 x 10<sup>5</sup> protoplastos/mL.
11. El tubo con los protoplastos se cubrió con papel aluminio y se incubó en hielo por 30 min.
12. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 200 x g, 2 min, 4°C. Se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió cuidadosamente en la solución MMg (Manitol 0.4 M, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, MES 4 mM, pH=5.7) en un volumen apropiado para tener 2 x 10<sup>5</sup> protoplastos/mL, agitando suavemente para homogenizar.

Para el caso del aislamiento de protoplastos de *Zea mays*, el protocolo se modifica sólo en los siguientes puntos:

Se utilizaron plantas de *Zea mays* crecidas en maceta con SunShine mix como sustrato de aproximadamente 16 días de crecimiento en oscuridad, para reducir el contenido de cloroplastos. La solución de enzimas de *Arabidopsis* se suplementa con: 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM β-mercaptoetanol y 0.1% BSA (Sigma-Aldrich). El procedimiento se siguió de la misma forma que para *Arabidopsis* siendo más cuidadosos con la resuspensión de los protoplastos, ya que los protoplastos de maíz tienen un color amarillo muy difícil de visualizar.

#### *Transfección DNA-PEG-Ca<sup>2+</sup>*

Todo se realizó a temperatura ambiente.

1. En un tubo de microfuga de 2 mL con fondo redondo se adicionaron: 10 µL de DNA (10-20 µg del vector con la HXK de interés) y 100 µL de protoplastos.
2. Para mezclar se golpea suavemente la base del tubo y se adicionan 110 µL de la solución de polietilenglicol (PEG) - 4000 (40% v/v). Se tapó el tubo y se mezcló suavemente por inversión.
3. La mezcla de transfección se incubó por 30 min a 25 °C, en oscuridad.
4. Para detener la reacción se añadieron 440 µL de solución W5 y se mezcló por inversión.
5. Se centrifugó a 200 x g, 2 min a 25 °C. Se desechó el sobrenadante con mucho cuidado para no perder protoplastos. Y el botón se resuspendió en 100 µL de la solución W5 con mucha delicadeza.
6. Por otra parte, se preparó una placa de cultivo celular de 6 pozos, se preparó añadiendo 1 mL de una solución de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich) al 5 %, solo se dejó que interactuara la solución por 1 s, después se lavó con un volumen de la solución W5, para evitar la adherencia de los protoplastos a la placa.
7. Una vez preparada la placa según se detalló en el punto 6, se añadieron los protoplastos resuspendidos. Cada pozo se usa para la transfección de los protoplastos con diferentes vectores.

8. Al final se cubría la placa con Parafilm y se incubaba por 16 a 20 h a 25 °C en oscuridad, esto para que el DNA se incorporara y las HXK-GFP fueran producidas por los protoplastos.
9. Finalmente se observaron los protoplastos y se identificó la localización de las proteínas mediante microscopía confocal con los filtros adecuados para observar la fluorescencia de GFP, teniendo en cuenta que la longitud de onda de excitación es de 395 nm y la de emisión de 508 nm. El análisis por microscopía confocal se llevó a cabo en el laboratorio de microscopía de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, UNAM, así como en el Laboratorio Central de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Cabe mencionar que las observaciones de protoplastos reportadas se realizaron con al menos dos réplicas biológicas encontrando el mismo resultado al analizar un promedio de 20 campos.

#### *Tinción nuclear de los protoplastos*

Para la tinción del núcleo de los protoplastos de plantas se utilizaron varios colorantes: el colorante Hoechst 33342 (ThermoFisher®), que tiene afinidad por el DNA de doble cadena y emite fluorescencia azul cuando se une a éste (Portugal y Waring, 1988) siendo su longitud de onda de emisión/excitación de 350 nm / 461 nm.

De igual manera se utilizó el colorante DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenindol) (ThermoFisher®) que también posee afinidad al DNA de doble cadena y es ampliamente utilizado como colorante nuclear, su longitud de onda de emisión/excitación es 358 nm/461 nm, y al igual que Hoechst emite fluorescencia azul (Trottas et al., 1993).

También se utilizó el colorante SYTO 63 (ThermoFisher®), cuya emisión de fluorescencia es roja, con una longitud de emisión de 673 nm y una de absorción de 657 nm. Además, se decidió usar este colorante ya que fue usado en estudios para determinar la localización subcelular de HXKs y otras proteínas en arroz (Cho et al., 2009; Wlodkowic et al., 2008).

Los protoplastos fueron trasladados a un tubo de fondo redondo y centrifugados a 200 x g, 2 min, a 25 °C. El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió suavemente en 100 µL de la solución W5. Se adicionaron 250 µL de la solución de Hoechst (0.5 µg/mL) a los protoplastos, luego se incubaron durante 1 h a 25 °C en oscuridad. Después se centrifugaron a 200 x g, 2 min a 25 °C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió gentilmente la suspensión de protoplastos en 100 µL de la solución W5. Los protoplastos deben mantenerse en oscuridad. Se utilizaron portaobjetos cóncavos para la observación en el microscopio confocal.

### Localización de ZmHXK6 y ZmHXKΔ30 en levaduras.

*Transformación de levaduras de alta eficiencia.*

**Día 1:** se inoculó a la cepa en 5 mL de medio YPD (Extracto de levadura, peptona y dextrosa) y se incubó toda la noche a 30 °C en agitación a 200 rpm.

**Día 2:** Se determinó el título de las células, colocando 10 µL de las células en 1 mL y midiendo la absorbancia a 600 nm. Teniendo en cuenta que una suspensión de  $10^6$  células/mL dará un valor de absorbancia de 0.1.

Utilizando el factor de conversión anterior se colocaron  $2.5 \times 10^8$  células en 50 mL del medio YPD precalentado y se incubó a 30 °C/200 rpm hasta que el título de las células fuera al menos de  $2 \times 10^7$  células por mL.

Mientras tanto, se desnaturalizó en un tubo de microfuga de 1.5 mL al DNA acarreador, colocándolo en un baño de agua hirviendo durante 10 min para inmediatamente colocarlo en un baño de hielo.

Se colectaron las células por centrifugación a 3000 x g/ 5 minutos. Se lavó el botón por duplicado con 25 mL de agua estéril y se resuspendió en 1 mL de agua estéril. La suspensión fue transferida a un tubo estéril de 1.5 mL, se centrifugó a 3000 x g / 30 s y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 1 mL de agua estéril, se homogeneizó y se tomaron alícuotas de  $10^8$  células dentro de tubos de 1.5 mL estériles, uno por cada transformación a realizar.

Se preparó la T-mix (de acuerdo a la Tabla 8) y se mantuvo en hielo.

Se añadieron 360  $\mu$ L de T-mix a cada tubo de transformación y se agitó en vórtex vigorosamente. Se incubaron los tubos en un baño de agua a 42 °C por 40 min. Después Se centrifugó a 3000 x g por 30 s y se desechó el sobrenadante. Se añadió 1 mL de agua estéril en el tubo de transformación y se resuspendió el pellet vigorosamente con vórtex.

Por último se inocularon 100  $\mu$ L de la mezcla de transformación en placas con medio de selección (SD, URA<sup>-</sup>), para incubarse a 30 °C por 3-5 días y se seleccionaron a aquellas levaduras que mostraban el fenotipo adecuado.

**Tabla 8.** Componentes de la T-mix.

<b>Componente</b>	<b>Volumen/360 <math>\mu</math>L (1 reacción)</b>
<b>PEG 3500 (50%)</b>	240
<b>LiAc 1M</b>	36
<b>ssDNA (2 mg/mL)</b>	50
<b>DNA plasmídico (1 <math>\mu</math>g)</b>	X
<b>Llevar a 360 <math>\mu</math>L con agua estéril</b>	

*Visualización en microscopio confocal.*

Se colocaron 100  $\mu$ L de las levaduras transfectadas en 5 mL de medio YPD y se incubaron toda la noche a 30 °C por 250 rpm.

Se pipeteó una alícuota de aproximadamente 70  $\mu$ L, dependiendo de la capacidad de los portaobjetos a utilizar, se cubrieron con el cubreobjetos y se visualizó en el microscopio confocal Olympus FLUOVIEW FV3000 de la USAII-Facultad de Química, UNAM utilizando los filtros para GFP y el campo claro.

## Obtención de plantas sobreexpresoras de ZmHXK6Δ30.

### *Transformación de Agrobacterium tumefaciens.*

Para la transformación de células competentes de *A. tumefaciens* se tomó 1 tubo con 100 µL de células competentes y se mezcló con 1 µg de plásmido, después se incubó por 5 min en nitrógeno líquido. Luego se incubó a 37 °C por 25 min. Se añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 28 °C en agitación a 225 rpm. Después se centrifugó a 13000 rpm por 2 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 100 µL de medio LB, mismos que fueron plaqueados en los medios selectivos. Las cajas se incubaron a 28 °C por 24 h y se eligieron a las colonias aisladas para llevar a cabo los siguientes experimentos.

### *Cultivo de Agrobacterium tumefaciens.*

Para la transformación de las plantas de *Arabidopsis* se obtuvo previamente un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* transformante para el gen de interés. El primer cultivo de la bacteria se comenzó a los 5 días antes de la transformación, inoculando las cepas de *A. tumefaciens* pGV2260/C58 (Donación del Dr. Javier Plasencia de la Parra) con el plásmido pEarleyGate103-ZmHXK6Δ30 y a la cepa *A. tumefaciens* P19 en medio LB 1.5 % agar, rifampicina 100 µg/mL + ampicilina (100 µg/mL) (+ kanamicina 100 µg/mL en el caso de la cepa que contiene el plásmido de interés).

Tres días después de su incubación a 28°C, se tomó una colonia y se inoculó en 5 mL de LB líquido suplementado con los antibióticos de selección y se incubó toda la noche a 28 °C con agitación de 250 rpm. Se tomaron 2 mL del medio saturado y se inocularon 250 mL de LB Rifampicina 50 µg/mL + Kanamicina 100 µg/mL, se incubó por 18 h a 30°C por 250 rpm hasta que se obtuviera una D.O.=1.0.

Finalmente se centrifugaron los medios a 6000 x g por 15 min a 4 °C y se resuspendieron en 100 mL de una solución de sacarosa al 5 % + Silwet L-77 (Sigma) 0.05% (Zhang et al., 2006).

#### *Crecimiento de plantas de Arabidopsis thaliana.*

Se crecieron plantas de *Arabidopsis* de manera similar a lo descrito anteriormente para la obtención de protoplastos. Solo que aquí las plantas tuvieron aproximadamente un mes de crecimiento y ya presentaban inflorescencias.

#### *Transformación de plantas de Arabidopsis por el método de inmersión floral.*

Tres o cuatro días antes de la transformación de las plantas de *Arabidopsis* se le cortó a cada planta la inflorescencia principal, se retiraron las yemas florales por abrirse, así como las flores, dejando sólo los botones. El día de la transformación las plantas se sumergieron de manera vertical invertida en la solución de *Agrobacterium* transformada con el vector de interés y se mantuvieron las plantas sumergidas por 1 min, al sacarlas se eliminó el exceso de solución con papel absorbente. Se colocaron a las plantas de forma horizontal en una charola y se cubrieron con un domo para que se conservara la humedad. Se dejaron en condiciones de invernadero durante un día. Después las plantas se regresaron a la posición vertical y se incubaron cubiertas con domo transparente por 3 días. Luego se retiró el domo y se transfirieron a una cámara con luz continua a una temperatura de 21 °C hasta la producción de semilla, aproximadamente por dos semanas.

#### *Obtención de plantas homocigotas.*

Para la obtención de plantas homocigotas se realizó una selección con BASTA, para ello se utilizó medio Gamborg L-5 suplementado con una concentración de BASTA (30 mg/mL), las placas se incubaron a 21 °C por 7 días en luz continua para acelerar el crecimiento de las plántulas y se eligió a las plántulas de mayor crecimiento que no presentaban rastros de clorosis, éstas fueron trasplantadas a tierra y se cultivaron hasta la producción de semilla. Se llevó a cabo este procedimiento por cuatro generaciones.

### *Evaluación genotípica de las plantas sobreexpresoras*

Las plantas de la generación F4 fueron crecidas en tierra y condiciones de invernadero (21 °C / fotoperiodo natural) por 1 mes. Se utilizó toda la parte aérea de dos plantas sanas para cada extracción de RNA, la que se llevó a cabo por el método del TRIzol, de la siguiente manera:

Se pulverizaron 0.5 g de tejido en un mortero (limpio y estéril) usando nitrógeno líquido. Se agregaron 3 mL de Trizol por cada gramo de tejido en el mortero. Se incubó a temperatura ambiente por 5 min y una vez líquida, la muestra se transfirió a un tubo de microfuga de 2 mL y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microfuga donde se añadieron 200 µL de FCL 25:24:1 (Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico) y se agitó por 15 s. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 min a 4°C. Se tomó la fase acuosa (superior) y en otro tubo se añadieron 400 µL de CHCl<sub>3</sub>. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 min a 4°C. Se colocó el sobrenadante en un tubo de microfuga limpio y se añadió un volumen de isopropanol, se mezcló en vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Nuevamente se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 mL de etanol (70% v/v). Se centrifugó a 13000 rpm por 5 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se secó el botón a temperatura ambiente por 5 min. Se disolvió el botón en 50 µL de agua + DEPC y se cuantificó en el Nanodrop 2000 (ThermoScientific®). El almacenamiento de la muestra se llevó a cabo a -70 °C.

Para verificar la integridad del RNA, se cargó el volumen correspondiente a 100 ng en un gel de agarosa al 0.7 % que se corrió a 85 V por 45 min y se visualizó en el transiluminador UV.

*Obtención de cDNA a partir de RNA total.*

Para la síntesis del cDNA se preparó la mezcla de acuerdo a como se indica en la Tabla 9. La reacción se colocó en el termociclador, donde se desnaturizó a 70 °C por 5 min, posteriormente se enfrió en hielo por 5 min.

**Tabla 9.** Componentes para la preparación de muestra de RNA.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para un volumen de reacción de 20 µL</b>
<b>RNA total</b>	1 µg
<b>OligodT 20 µM</b>	1 µL
<b>Agua + DEPC</b>	cbp 10 µL

Para realizar la reacción de PCR se preparó la mezcla de reacción que se indica en la Tabla 10 en otro tubo de PCR. Se agitó en un vórtex y se tomó totalmente ese volumen y añadió a la mezcla que se hizo con las indicaciones de la Tabla 9. Luego se colocó en el termociclador con el siguiente programa de temperaturas indicado en la Tabla 11. El cDNA fue almacenado a -20 °C para su uso posterior.

**Tabla 10.** Componentes de la mezcla de reacción de retrotranscripción.

<b>Componente</b>	<b>Cantidad para un volumen de reacción de 20 µL</b>
<b>Buffer Improm-II™ 5X</b>	4 µL
<b>MgCl<sub>2</sub> 25 mM</b>	2.4 µL
<b>dNTP's 10 mM</b>	1 µL
<b>RT</b>	1 µL
<b>Agua libre de nucleasas</b>	cbp 10 µL

**Tabla 11.** Programa de temperatura del termociclador.

Temperatura	Tiempo
25 °C	5 s
42 °C	60 s
70 °C	5 s

*PCR para amplificar el gen de ZmHXK6Δ30 usando cDNA de las plantas sobreexpresoras.*

Se llevó a cabo el procedimiento anteriormente mencionado para la reacción de PCR, con los oligonucleótidos específicos (Anexo I). La amplificación se llevó a cabo con el siguiente programa de temperaturas en el termociclador: una desnaturalización inicial a 98 °C por 60 s, 33 ciclos de: desnaturalización de 98 °C a 10 s, alineamiento 55 °C por 5 s y extensión 72 °C por 2 min. Al final se realizó una extensión final a 72 °C por 10 min. Una vez obtenidos los amplicones se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa (0.7 %) y se comprobó que tuvieran el peso esperado comparando con el marcador de tamaño molecular.

*Evaluación fenotípica de las plantas sobreexpresoras.*

**Desinfección de semillas.** En condiciones de esterilidad, las semillas a desinfectar se colocaron en un tubo de microfuga de 1.5 mL estéril, se les añadió 1 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 20 % elaborada a partir de cloro comercial (Cloralex®) y 1 µL de una solución de Tween-20 con una concentración al 0.1% (v/v). Esta suspensión de semillas se agitó por 20 min en un agitador eléctrico, se centrifugó en una minifuga y se desechó el sobrenadante. Se añadió 1 mL de la solución de hipoclorito de sodio al 20 % y se agitó por 10 min, de nuevo se centrifugó en la minifuga y se retiró el sobrenadante. Se realizaron 5 lavados consecutivos con 1 mL agua estéril, con periodos de agitación de 30 s seguidos de una centrifugación de 10 s entre cada lavado. Las semillas se resuspendieron en 1 mL de agua estéril y están listas para ser sembradas en cajas Petri.

**Siembra de semillas.** Para ello se tomaron aproximadamente 200  $\mu$ L de la suspensión de semillas, se retiró la punta de la micropipeta y sin dejar caer el contenido se trató de colocar una semilla por cada cuadro de la caja Petri (cuadrada y cuadriculada, de 8 cm por lado). Los medios en las cuales fueron sembradas las semillas fueron: Gamborg B5 (Gamborg, Miller, y Ojima, 1968), MS (Murashige y Skoog, 1962) y sólo agar (1%), con y sin glucosa o manitol añadidos.

Una vez colocadas las semillas, se dejó secar un poco la caja en la campana de flujo laminar, para evitar que las semillas se movieran. Después se llevó a cabo el procedimiento de estratificación, incubando a 4 °C por 48 h en oscuridad. Una vez transcurrido este tiempo se colocaron las cajas con las semillas en una cámara con fotoperiodo de 8 h luz y 16 h oscuridad, poniéndolas en posición inclinada, casi vertical. Así se incuban por 7 días, luego de lo cual se lleva a cabo la toma de fotografías para documentar su fenotipo.

## Resultados

### Tres HXKs de maíz presentan una posible secuencia de localización nuclear o NLS.

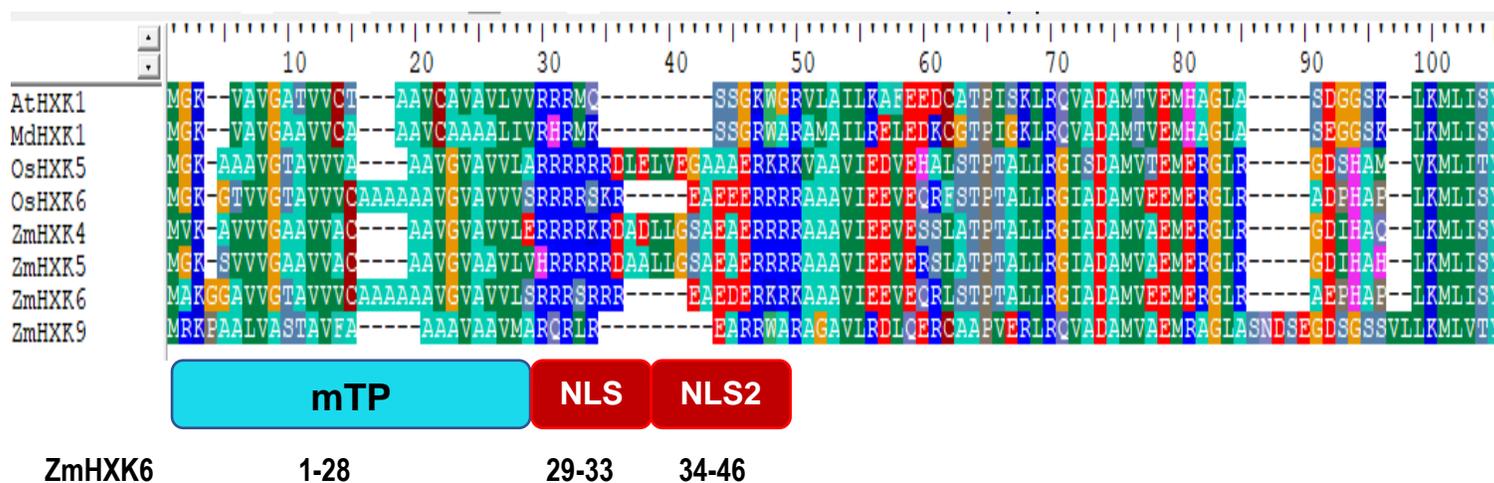
Para identificar si las HXKs de maíz presentaban una señal de localización nuclear o NLS se realizó un análisis *in silico* de sus secuencias y se comparó con las secuencias de HXKs predichas como nucleares (AtHXK1, OsHXK5, OsHXK6; (Cho et al., 2006; Cho et al., 2009), usando las herramientas bioinformáticas en línea NucPred (Brameier et al., 2007) NLStradamus (Nguyen Ba et al., 2009) y LOCALIZER (Sperschneider et al., 2017).

Tres HXKs de maíz presentaron NLS: ZmHXK4, ZmHXK5 y ZmHXK6. Las tres son HXKs que se encuentran en la mitocondria cuando están en su versión silvestre (Aguilera-Alvarado et al., 2019). Las secuencias predichas como NLS son más largas con el programa LOCALIZER que con NLStradamus, excepto para las HXK6 de arroz y maíz, en donde ambas se predicen con una longitud similar. En cuanto a los resultados de NucPred, un número mayor a 0.2 se considera que la proteína posee un NLS.

**Tabla 12.** Identificación de la secuencia NLS en diferentes HXKs mediante análisis *in silico*.

HXK	NucPred	NLStradamus	LOCALIZER
AtHXK1	0.04	-----	-----
ScHXK2	0.23	-----	-----
OsHXK5	0.31	25 – RRRRRR – 30	26 -RRRRRDLELVGAAERKR - 46
OsHXK6	0.28	29 – RRRRSKREAEERRRRA – 45	29 – RRRRSKREAEERRRRAA - 46
ZmHXK3a	0.12	-----	-----
ZmHXK3b	0.11	-----	-----
ZmHXK4	0.27	25 – RRRRKR – 30	26 – RRRKRDADLLGSAEAERRR - 46
ZmHXK5	0.26	27 – RRKR – 30	26 – RRRKRDALLGSAEAERRR - 46
ZmHXK6	0.29	30 – RRRSRREAEDERKRKA – 46	30 – RRRSRREAEDERKRKAA - 47
ZmHXK7	0.06	-----	-----
ZmHXK8	0.04	-----	-----
ZmHXK9	0.03	-----	-----
ZmHXK10	0.07	-----	-----

También se realizó el alineamiento de las secuencias con el programa Clustal W de las HXKs que ya se ha demostrado tienen localización nuclear de otras especies (Cho et al., 2009) con las HXK elegidas de maíz, se usó el programa Clustal W. En la Figura 8 se muestran los resultados del alineamiento de los primeros 108 aminoácidos de esas proteínas. El alineamiento de las secuencias completas se encuentra en el anexo II. Destaca la similitud de secuencia en la región del amino terminal de las proteínas entre ZmHXK4, 5, 6 y OsHXK5 y 6. Se ha demostrado que OsHXK5 y OsHXK6 pueden tener una localización tanto mitocondrial como nuclear (Cho et al., 2009), lo que sugiere que ZmHXK4, ZmHXK5 y ZmHXK6 también podrían encontrarse no solo en la mitocondria sino en el núcleo y que su localización nuclear podría ser dependiente de la NLS.



**Figura 8.** Alineamiento de los extremos amino-terminal de las diferentes HXK de maíz (ZmHXKs), *A. thaliana* (AtHXK1), manzana (MdHXK1) y arroz (OsHXKs) e identificación de la mTP y NLS en ZmHXK6. Colores iguales por columna muestran que el aminoácido es idéntico en las diferentes secuencias.

Adicionalmente, en la Figura 8 se muestra la zona que correspondería a la secuencia de anclaje a la mitocondria o mTP y las dos secciones que se predicen que forman la NLS en ZmHXK6 y que es similar a la observada en OsHXK6 (Figura 8).

## Producción de las versiones truncas de ZmHXK6 como proteína de fusión con GFP.

Una vez identificadas las posibles secuencias que pueden funcionar como NLS, se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar las diferentes versiones truncas de ZmHXK4, ZmHXK5 y ZmHXK6, con la finalidad de encontrar si hay una sección de aminoácidos de la proteína que podría ser funcional como NLS.

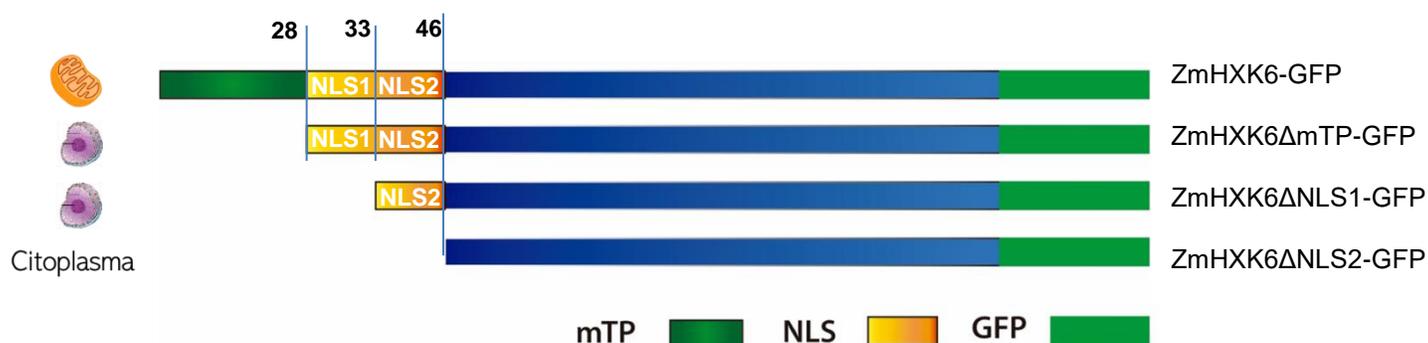
No se lograron generar las versiones truncas de ZmHXK4 y ZmHXK5, por lo que este trabajo centró en las versiones truncas de ZmHXK6. Además, se continuó el trabajo solo con ZmHXK6 ya que anteriormente había demostrado un comportamiento interesante al ser deletados sus primeros 30 aminoácidos en el extremo amino terminal: formaba agregado que no colocalizaron con la mitocondria (Aguilera-Alvarado et al., 2019), lo que hacía sospechar que podría ser una proteína nuclear.

Las tres versiones de ZmHXK6 que se carecen de la mTP que lleva a las proteínas a anclarse a la membrana externa mitocondrial, ZmHXK6 $\Delta$ mTP, ZmHXK6 $\Delta$ mTP $\Delta$ NLS1 y ZmHXK6 $\Delta$ mTP $\Delta$ NLS2, en donde la segunda y la tercera construcción perdieron la primera región de argininas cercana al amino terminal o bien perdieron toda la secuencia predicha como NLS. Según se muestra en la Figura 9, la versión completa de HXK6 se encontraría en la mitocondria; ZmHXK6 $\Delta$ mTP podría encontrarse en el núcleo al igual que ZmHXK6 $\Delta$ mTP $\Delta$ NLS1, ya que ambas exponen una sección de la NLS y la última versión de ZmHXK6 sin NLS se localizaría en el citoplasma.

Para facilitar su identificación, se decidió nombrar a cada una de las versiones truncas con la región eliminada más lejana del amino terminal, como se muestra en la figura 9.

Todas las versiones de ZmHXK6 se clonaron en pGEMT-easy para luego introducirse en el vector pDONR 221 y de ahí, a través de recombinación, se introdujo el transgene al vector de expresión en plantas, el vector pEarley Gate 103 y se enviaron a secuenciar al área de secuenciación del IBT, UNAM. Las secuencias se encuentran completas, sin mutaciones y corresponden a las deleciones

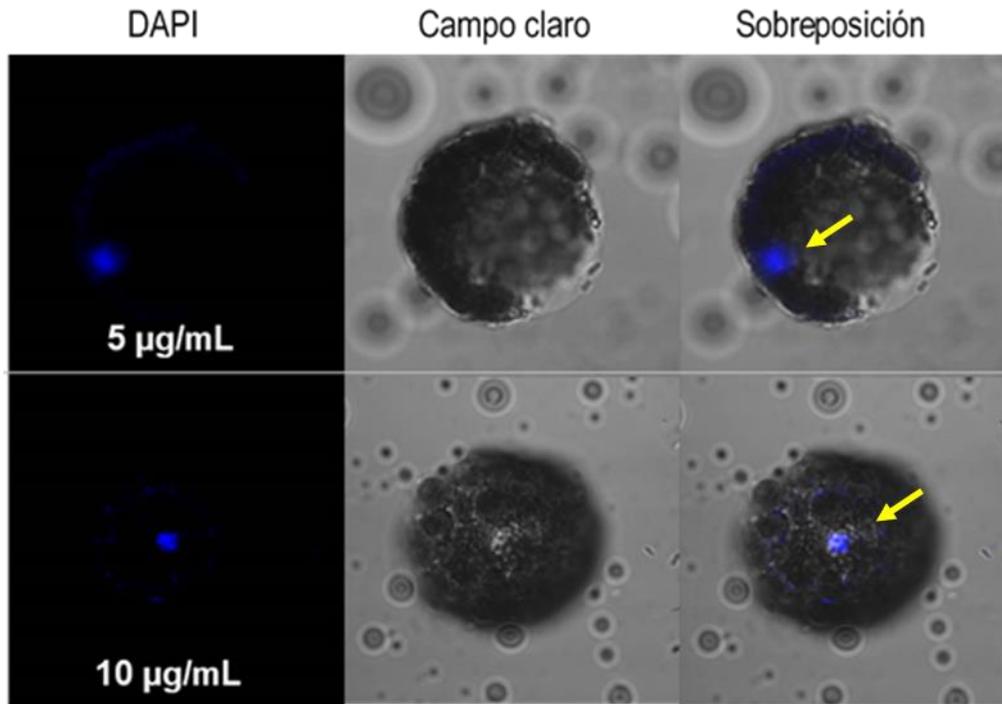
deseadas (Anexo III). Adicionalmente, en este trabajo también se utilizó la versión ZmHXK6 $\Delta$ 30-GFP que ya se había obtenido en un trabajo anterior (Aguilera-Alvarado et al., 2019). En esos 30 aminoácidos se encuentra el mTP y un par de argininas que podrían corresponder al primer cluster básico de la NLS.



**Figura 9.** Diagrama que representa las diferentes versiones de ZmHXK6 que se generaron, así como su localización esperada de acuerdo con los resultados del análisis bioinformático.

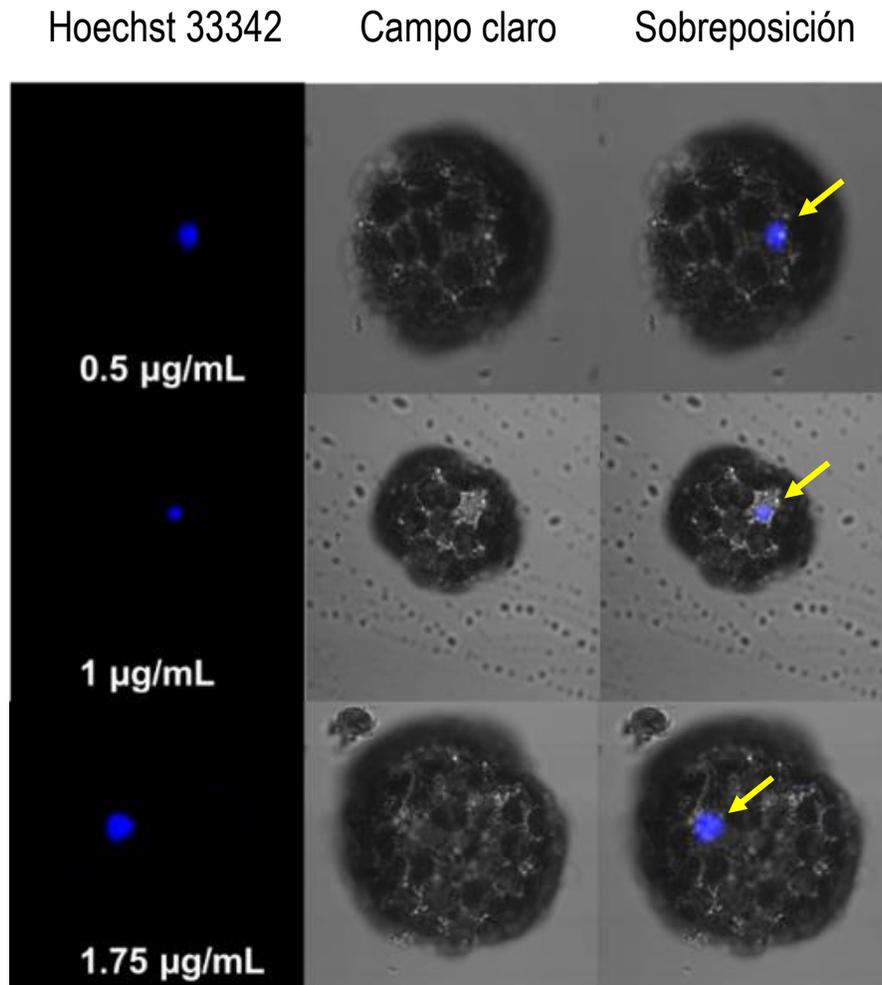
ZmHXK6 $\Delta$ 30 se localiza en el núcleo de protoplastos de *Arabidopsis*.

Para los ensayos de localización subcelular se utilizaron varios controles, uno de ellos fue el uso de colorantes que específicamente se unen al núcleo. DAPI es un colorante muy usado, ya que su unión al núcleo se basa en la interacción con regiones de DNA de doble cadena, especialmente con aquellas que contienen más de un par de bases A-T, aumentando su fluorescencia 20 veces. Sin embargo, tiene la desventaja de no ser permeable a las células en bajas concentraciones (Portugal y Waring, 1988). Se probaron las condiciones para establecer la concentración adecuada del colorante para teñir los núcleos, encontrando que entre 5 y 10  $\mu$ g/mL el colorante se encontraba de manera específica en los núcleos de los protoplastos de *Arabidopsis*, se señala en la figura 10 con las flechas amarillas. Sin embargo, también observamos que la tinción no es reproducible debido a que se probaron distintas condiciones y aun así la tinción de núcleos no era uniforme, por lo que no se omitió en posteriores experimentos.



**Figura 10.** Observación en microscopio confocal de la tinción de protoplastos de *A. thaliana* con el colorante DAPI. Los protoplastos muestran una forma redonda y con abundantes cloroplastos en el interior, en una zona localizada se encuentra el colorante. La presencia del colorante se obtuvo al usar las longitudes de onda 358 nm/ 461 nm (excitación/emisión), en el microscopio confocal Olympus BX51 (USAII, Facultad de Química, UNAM).

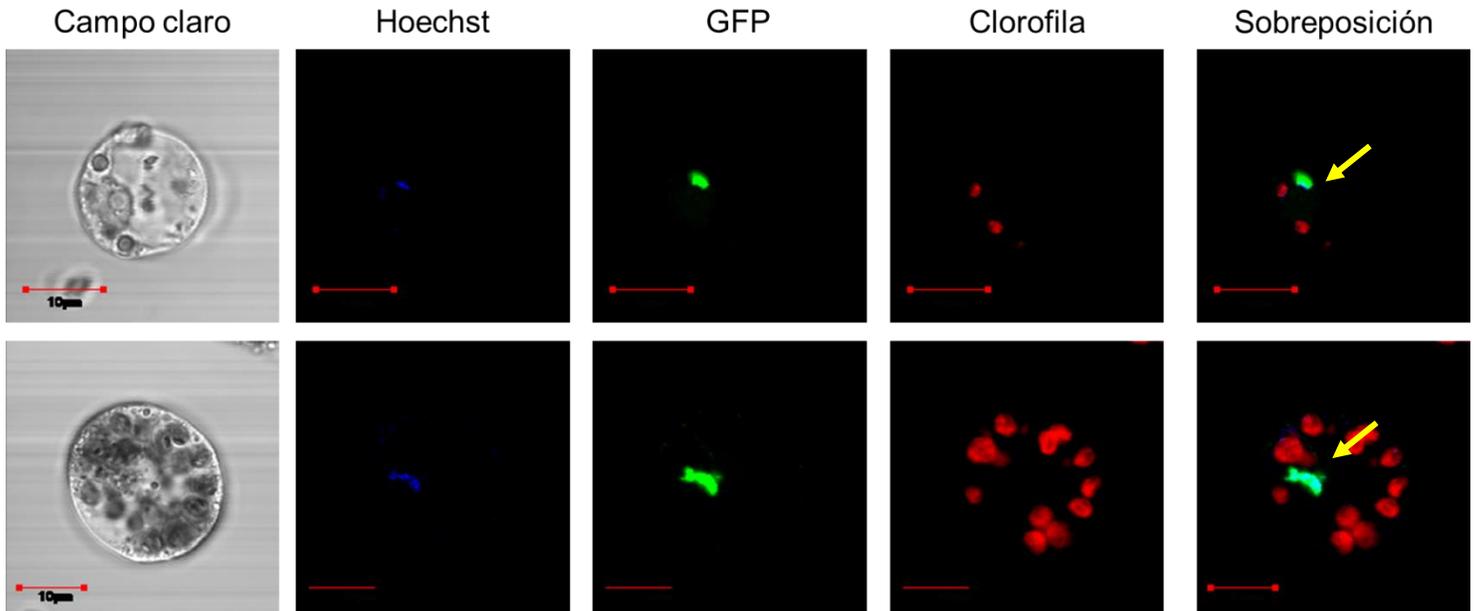
Otro colorante utilizado para demostrar la localización del núcleo es el Hoechst 33342, que tiene propiedades similares al DAPI. Se sabe que su unión al DNA de doble cadena se ve favorecida por la presencia de más de cuatro pares de bases A-T consecutivos. La gran ventaja de éste colorante sobre DAPI es la mayor permeabilidad que tiene, pues puede introducirse más fácilmente en las células (Portugal y Waring, 1988). También se probaron diferentes concentraciones de este colorante, encontrando una señal intensa en todas las concentraciones, marcado con las flechas amarillas (Figura 11).



**Figura 11.** Tinción de protoplastos de *A. thaliana* con el colorante Hoechst 33342 (Sigma®). Los protoplastos presentan una gran cantidad de cloroplastos, y en una zona localizada se encuentra el colorante. La presencia del colorante se obtuvo al usar las longitudes de onda 350 nm/ 461 nm (excitación/emisión), en el microscopio confocal Olympus BX51 (USAII, Facultad de Química, UNAM).

Se realizaron muchos ensayos con el Hoechst 33342 encontrándose que la tinción era más reproducible que el DAPI, aunque había que preparar y usar stocks de un solo uso para evitar ciclos de congelamiento-descongelamiento. En adelante se utilizó este colorante, pero dividido en alícuotas pequeñas para cada uso.

Como uno de los objetivos del trabajo era determinar la localización de ZmHXK6 $\Delta$ 30 se realizó una tinción con Hoechst 33342 de protoplastos que expresaban transitoriamente ZmHXK6 $\Delta$ 30-GFP (Figura 12).

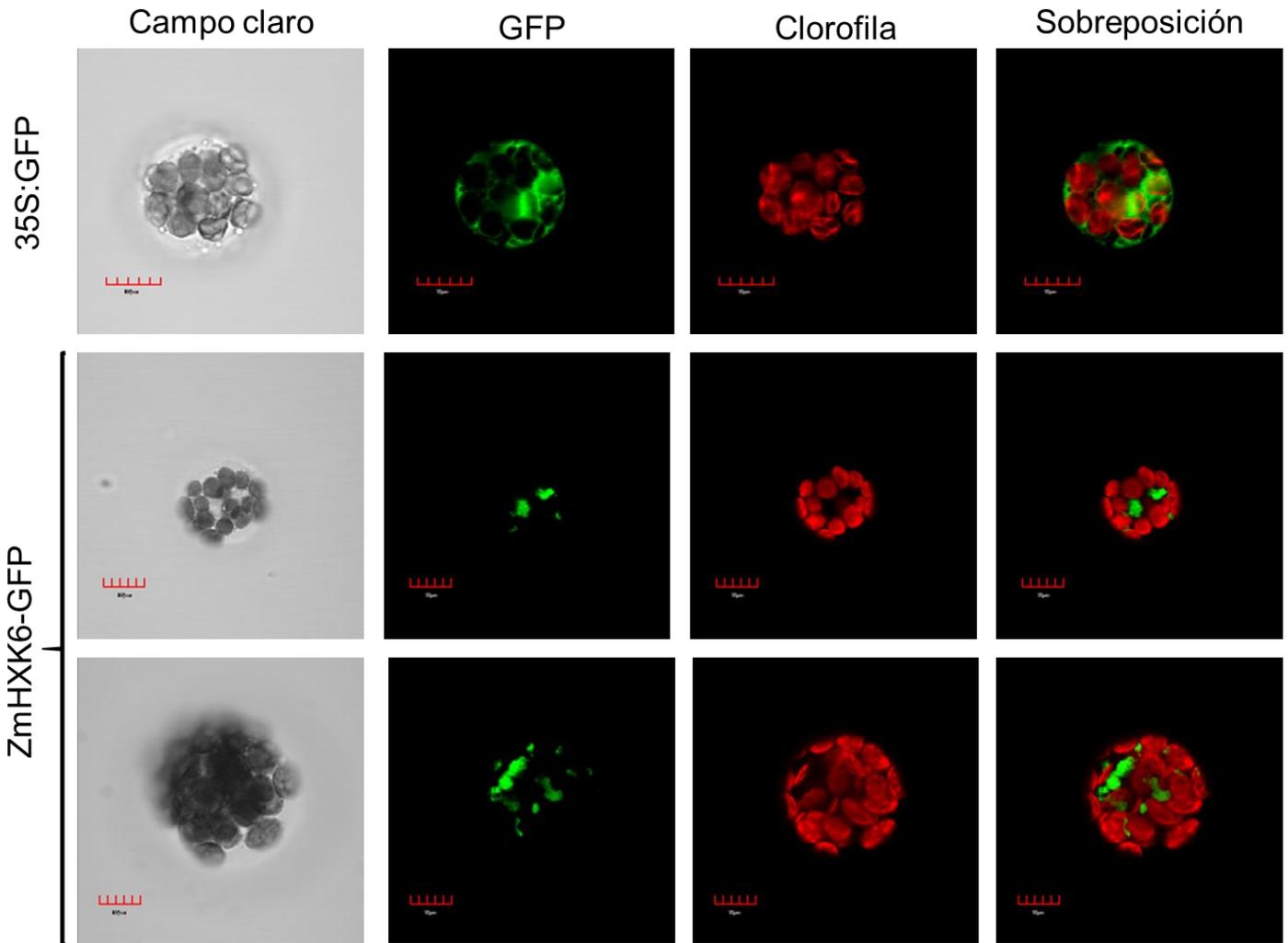


**Figura 12.** Observación de los protoplastos expresando la proteína ZmHXK6 $\Delta$ 30-GFP teñidos con el colorante Hoechst 33342. La presencia del colorante se obtuvo al usar las longitudes de onda 350 nm/ 461 nm (excitación/emisión). La presencia de GFP se determinó al usar las longitudes de onda 488 nm/ 505-545 nm en el microscopio confocal Olympus BX51 (USAII, Facultad de Química, UNAM). Las flechas amarillas indican la colocación de la señal de la proteína y el colorante.

Observamos que en el campo del colorante hay señales difusas azules en más de un punto, aunque hay un punto más intenso (Figura 12), mientras que al observar el campo en la señal que emite GFP se observa una señal intensa en un punto y algunas señales difusas. Al sobreponer los campos de las señales del colorante y de GFP se observa que la señal que se empalma dando una coloración verde-azul en un punto. Lo anterior indica que al menos la versión que carece de los primeros 30 aminoácidos de la región N-terminal puede localizarse en el núcleo, además la señal difusa alrededor indica hay ZmHXK6 $\Delta$ 30-GFP en el citoplasma.

Para demostrar que las señales observadas en la Figura 12 no se debían a la agregación de GFP, se realizaron controles que consistieron en: transfectar protoplastos de *A. thaliana* con el vector que solo contenía GFP bajo el promotor 35S y con el vector que contenía la versión completa de ZmHXK6 unida a GFP (Figura 13). GFP solo se distribuyó en el citoplasma, lo cual se esperaba de una proteína que es hidrofílica. Mientras que ZmHXK6-GFP se distribuía tanto en el citoplasma, como en puntos discretos y formando agregados, distinto a lo observado con GFP solo, como ya se había observado anteriormente (Aguilera-Alvarado et al., 2019). Por lo que con los resultados de las Figuras 12 y 13 se sugiere que una parte de ZmHXK6 se encuentra en el citoplasma, otra posiblemente en mitocondria (datos de Aguilera Alvarado et al., 2019) y otra en el núcleo.

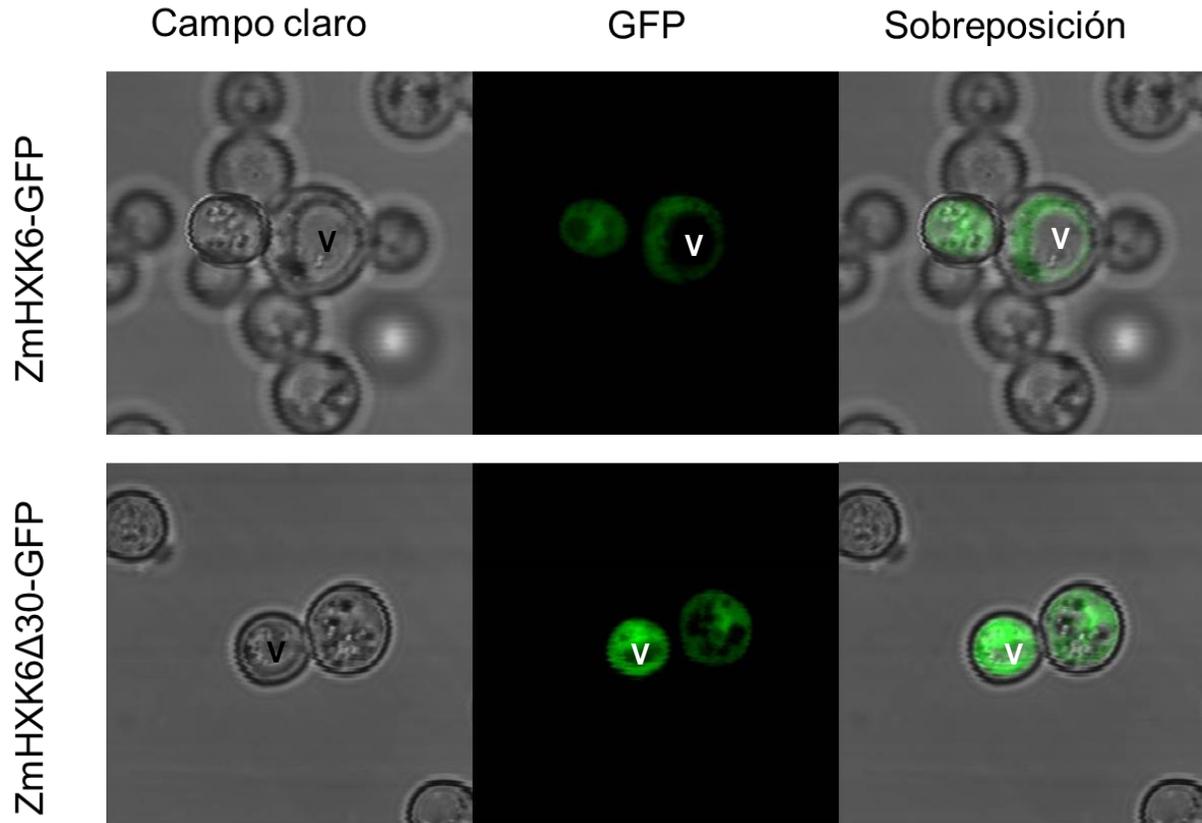
Con la finalidad de observar si este comportamiento de ZmHXK6 $\Delta$ 30 era exclusivo del sistema de plantas y por la conveniencia de utilizar un organismo modelo como *S. cerevisiae*, en el que se puede expresar de manera ectópica a la proteína, se usó a la levadura para expresar y localizar a la proteína. Se aprovechó que los vectores pDONR221-ZmHXK6 y pDONR221-ZmHXK6 $\Delta$ 30 ya se tenían en el laboratorio (Aguilera-Alvarado et al., 2019). Estos fueron utilizados como templado para que mediante recombinación se introdujeran cada uno de los genes de interés unidos a un vector de expresión para levaduras que además las etiquetara con GFP. Las levaduras transformadas fueron observadas en un microscopio confocal (Figura 14).



**Figura 13.** Ensayos de expresión heteróloga de 35S:GFP y ZmHXK6-GFP en protoplastos de *A. thaliana*. La presencia de GFP se determinó al usar las longitudes de onda 488 nm/ 505-545 nm en el microscopio confocal Olympus BX51 (USAI, Facultad de Química, UNAM). En rojo se observan los cloroplastos. Se muestran dos réplicas de la expresión de ZmHXK6-GFP, ya que los protoplastos que se obtuvieron presentaban tamaños distintos. Barra de tamaño: 10  $\mu$ m.

Se encontró que la transformación fue exitosa y la proteína se encuentra a niveles altos, a juzgar por la intensidad de la señal en las células, sin embargo, esa señal se encontró distribuida en toda la levadura, excepto en el interior de las vacuolas (Figura 14). Es decir, en este sistema no se forman agregados de proteína, lo que sí parece ser exclusivo de plantas. Al no poder discernir ninguna diferencia entre la versión truncada y la versión silvestre de ZmHXK6 se decidió no usar este sistema

para los ensayos de localización de las diferentes versiones truncas y se siguió utilizando a los protoplastos de plantas.

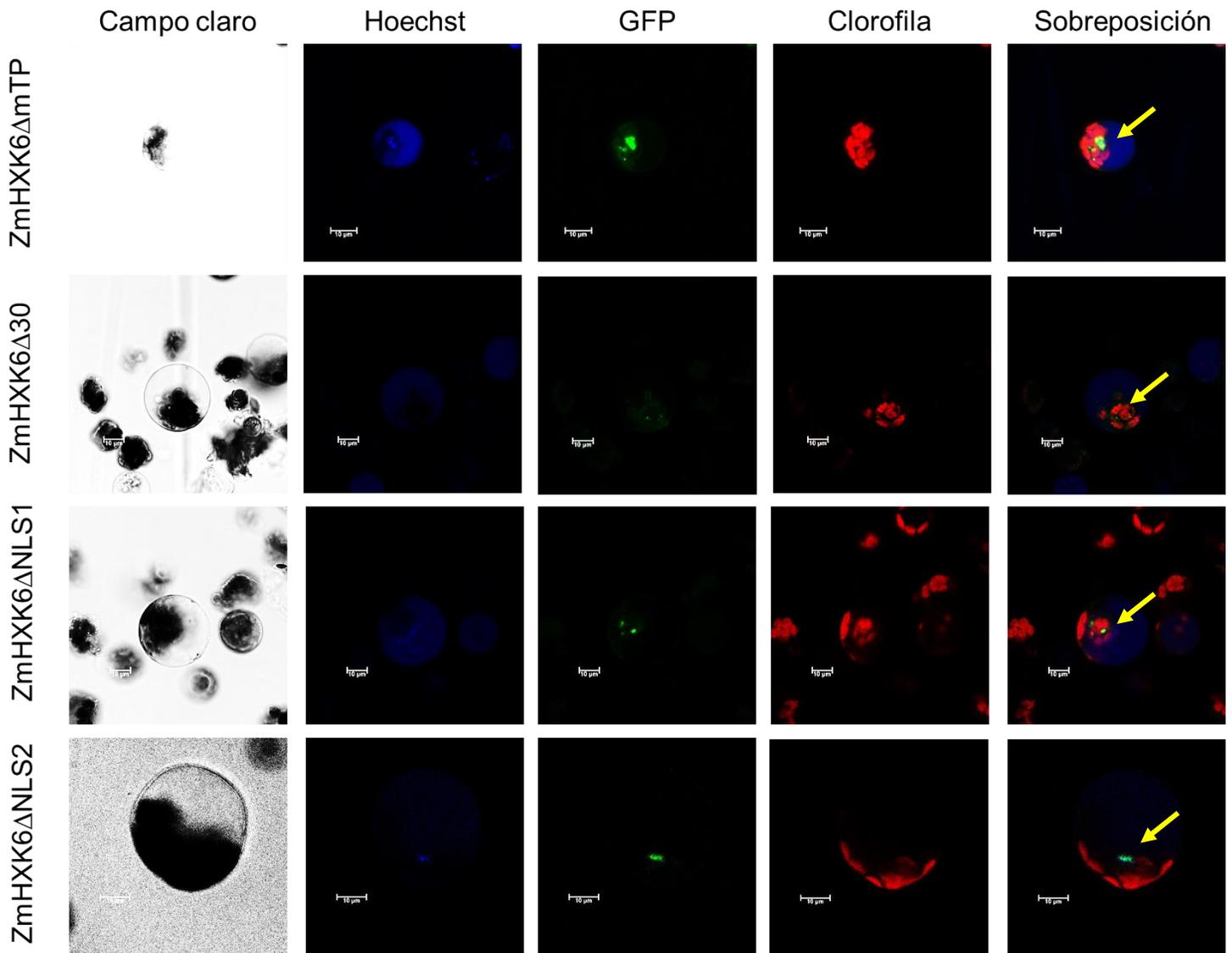


**Figura 14.** Ensayos de localización subcelular de las proteínas de fusión en *S. cerevisiae*. La presencia de GFP se determinó al usar las longitudes de onda 488 nm/ 505-545 nm en el microscopio confocal Olympus BX51 (USAII, Facultad de Química, UNAM).

## **La pérdida de la mTP lleva a que ZmHXK6 se localice en el núcleo de protoplastos de *Arabidopsis* y maíz**

Con el objetivo de determinar qué parte de la región del amino terminal y en particular de la posible NLS podría funcionar como señal de localización nuclear, se transfectaron protoplastos de *A. thaliana* con las cuatro versiones truncas de ZmHXK6, usando el colorante Hoechst 33342 como marcador de co-localización nuclear (Figura 15).

En las fotografías del campo claro se observan los protoplastos de *Arabidopsis* con una gran cantidad de cloroplastos. En las fotografías en donde se analizó la tinción de Hoechst observamos que la tinción no fue exclusiva de núcleo, sino que se tiñó también el citoplasma pese a que se siguieron las condiciones ya establecidas con anterioridad. En el canal de GFP se logran observar puntos localizados en el núcleo (según la co-localización con la señal de Hoechst) de todas las versiones de ZmHXK6 truncas, en tanto que ZmHXK6 $\Delta$ 30-GFP y ZmHXK6 $\Delta$ NLS1-GFP muestran algunas señales difusas en el citoplasma. De acuerdo con lo observado se sugiere que todas las versiones truncas de ZmHXK6 se localizan en el núcleo, aún la versión que no posee NLS.

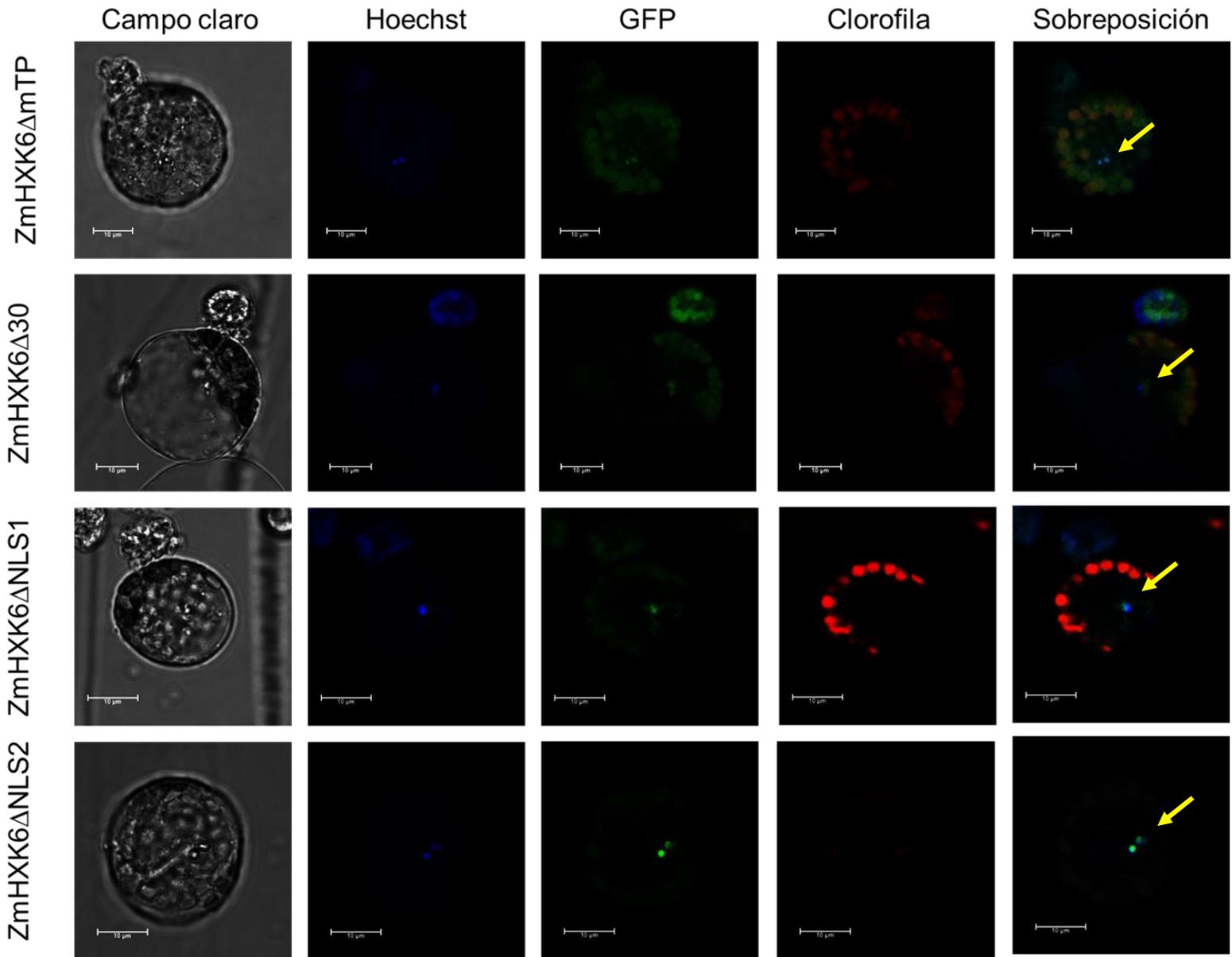


**Figura 15.** Localización subcelular de las versiones truncas de ZmHXK6 en protoplastos de *A. thaliana*. Observación de los protoplastos expresando las proteínas ZmHXK6 $\Delta$ 30-GFP y teñidos con el colorante Hoechst. La presencia del colorante se detectó al usar las longitudes de onda 350 nm/ 461 nm (excitación/emisión). La presencia de GFP se determinó al usar las longitudes de onda 488 nm/ 505-545 nm en el microscopio confocal del Laboratorio Central, Facultad de Ciencias, UNAM.

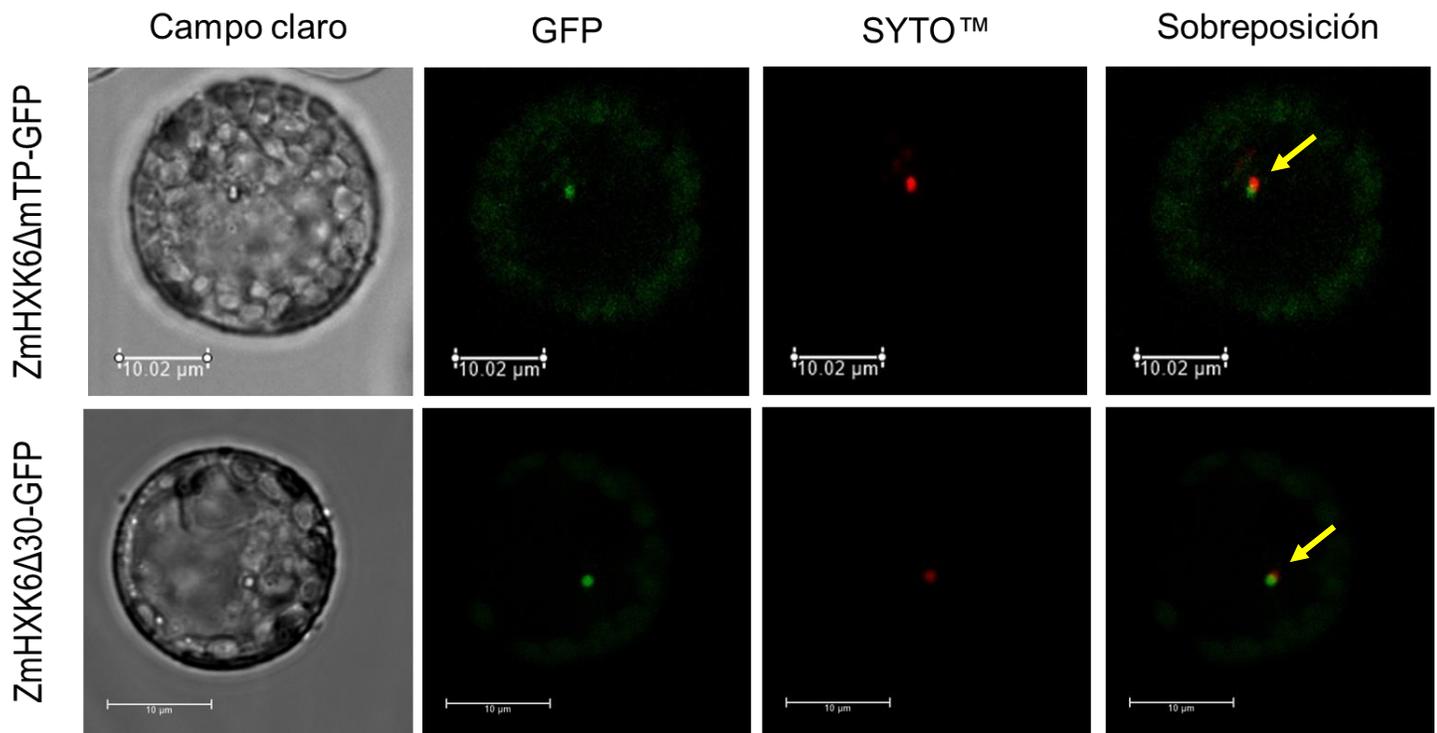
Debido a que los resultados no eran claros respecto a la tinción del Hoechst y a que el sistema que se estaba usando era un sistema heterólogo, se obtuvieron protoplastos del sistema homólogo. Los protoplastos de maíz fueron transformados con los vectores de expresión para las diferentes versiones truncas de ZmHXK6 (Figura 16). Se realizaron las observaciones en el campo claro, donde se encontraron protoplastos redondos, aunque algunos de ellos contenían material celular adherido en el exterior del protoplasto. En el canal de emisión del colorante Hoechst se observó que no solo los núcleos se teñían, sino también el citoplasma, fenómeno que se observó aun cuando se variaron el tiempo de incubación con el colorante. En el canal de GFP se observó que se teñían las zonas alrededor de los cloroplastos sobre todo en ZmHXK6 $\Delta$ mTP y ZmHXK6 $\Delta$ 30, que podría corresponder a una tinción citoplasmática. Además, se tiñó intensamente un punto en todas las versiones, mismo que cuando se realizó la sobreposición con el canal de Hoechst se observó un solapamiento de las señales. Nuevamente todas las versiones de HXK6 sin mTP se encontraron en el núcleo y en menor medida, en el citoplasma.

Considerando que el colorante Hoechst se distribuía no solo en el núcleo sino en otras partes de la célula, se utilizó otro colorante para teñir el núcleo, SYTO™, el cual se sugería mejor que otras sondas nucleares (Cho et al., 2009), ya que puede entrar mejor a la célula (mayor permeabilidad) y tiene mayor emisión de fluorescencia. Además, SYTO™ fue el colorante usado en el estudio de Cho y colaboradores (2009) para demostrar la presencia de las hexocinasas de arroz, OsHXK5-GFP y OsHXK6-GFP, en el núcleo. En la figura 17 se puede observar que SYTO™ marca preferencialmente el núcleo y que la señal de GFP de ZmHXK6 $\Delta$ mTP y ZmHXK6 $\Delta$ 30 se encuentra en un punto delimitado en la célula, al sobreponer las imágenes se encuentra que las señales de SYTO™ y GFP se superponen.

Por lo que en el sistema homólogo de expresión ZmH XK6 $\Delta$ mTP y ZmH XK6 $\Delta$ 30 están en el núcleo (Figura 17). Lamentablemente, las dos proteínas truncas restantes no pudieron ser observadas en el microscopio confocal dado que no se encontraron protoplastos que estuviesen expresando la proteína.



**Figura 16.** Las HXKs de maíz se localizan tanto en núcleo como en citoplasma. Los ensayos de localización subcelular de ZmH XK6 y sus versiones truncas se realizaron en protoplastos de *Z. mays*. La presencia del colorante se detectó al usar las longitudes de onda 350 nm/ 461 nm (excitación/emisión). La presencia de GFP se determinó al usar las longitudes de onda 488 nm/ 505-545 nm en el microscopio confocal del Laboratorio Central, Facultad de Ciencias, UNAM.



**Figura 17.** Protoplastos de hojas de *Z. mays* transfectados con las versiones truncas de ZmHXK6. La presencia del colorante SYTO se detectó al usar las longitudes de onda 658 nm/ 673 nm (excitación/emisión). La presencia de GFP se determinó al usar las longitudes de onda 488 nm/ 505-545 nm en el microscopio confocal del Laboratorio Central, Facultad de Ciencias, UNAM.

ZmHXK6 tiene una región N-terminal distinta a las otras HXKs de maíz.

Para comparar la estructura de las diferentes HXKs y que pudieran contribuir a explicar por qué las HXKs pueden migrar al núcleo. Se introdujeron las secuencias de todas las hexocinasas de maíz al servidor I-TASSER. Se incluyeron varias proteínas como control: a AtHXK1, ya que es la única HXK de plantas que ha sido cristalizada, además de ser la HXK sensora más estudiada (Feng et al., 2015; Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017) y también a MdHXK1 que recientemente se encontró que tiene la capacidad no solo de fosforilar hexosas sino también proteínas, lo que permite regular la fisiología de la planta en situaciones de estrés salino (Hu et al., 2016; Sun et al., 2018).

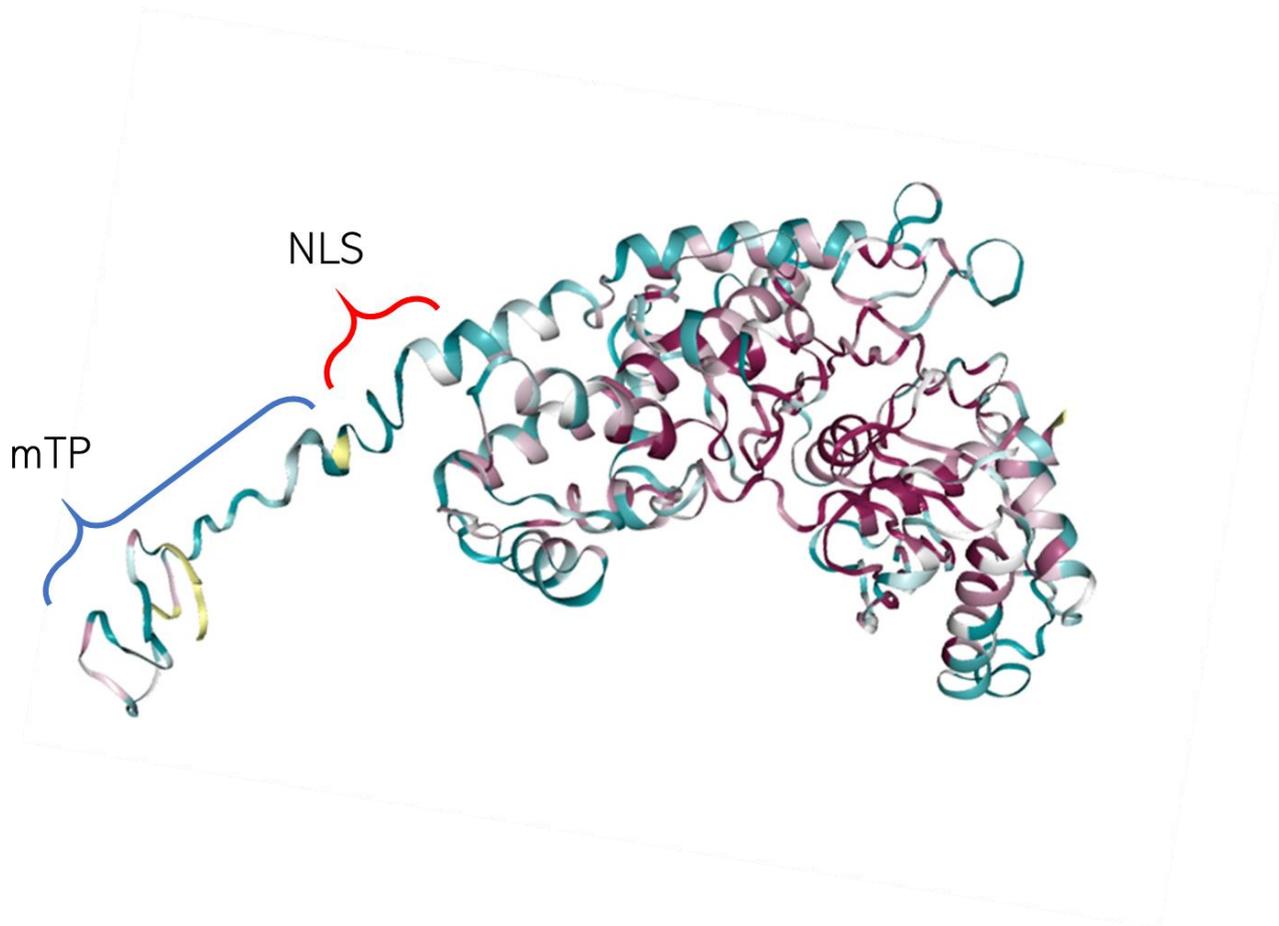
Al observar los modelos fue evidente que las seis ZmHXKs tienen una gran similitud estructural (Figura 19), la variación más clara entre todas ellas se muestra en el extremo amino terminal.

Se observan claramente dos dominios, uno más grande, que es en donde se encuentran la mayor parte de las  $\alpha$ -hélices, y un segundo dominio en donde la proteína se estructura en  $\alpha$ -hélices y hojas  $\beta$  y que es el encargado de la unión de la molécula de glucosa. Cabe destacar que los modelos estructurales que se parecen más son AtHXK1, MdHXK1 y ZmHXK9 (Figura 20), lo que podría indicar que ZmHXK9 tiene la capacidad de funcionar como proteína sensora y por lo tanto es necesario un estudio más detallado de esta enzima.

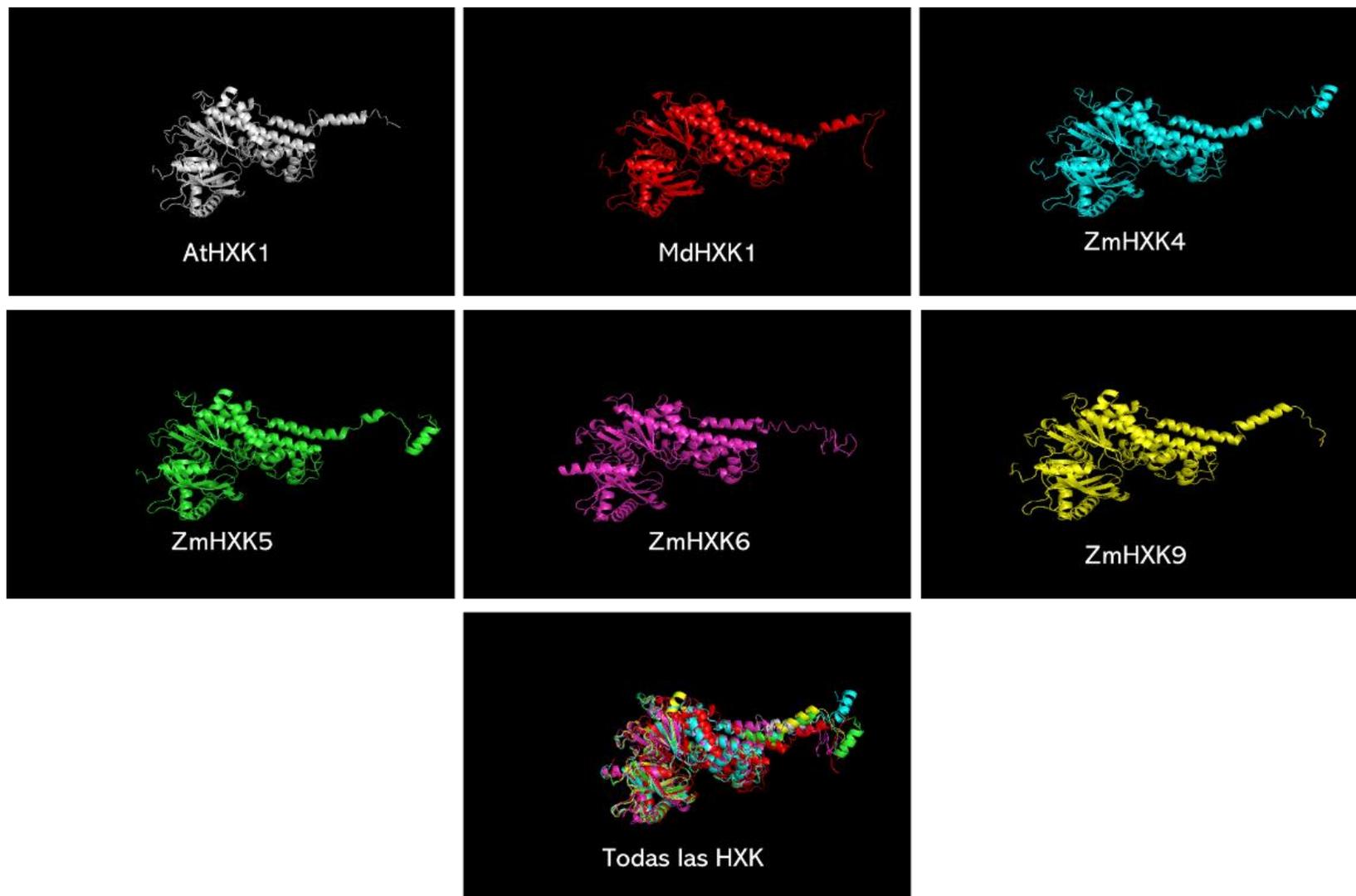
Al sobreponer a todas las HXKs se observa que la región N-terminal de la estructura no queda totalmente traslapada. Por lo que se tomaron los primeros 100 aminoácidos de cada secuencia y se volvió a solicitar el modelaje tridimensional en la plataforma de I-TASSER (Figura 21). En la región modelada se encuentran la región que le permite a la HXK anclarse a la membrana externa mitocondrial y también se encuentra la secuencia que corresponde a la posible NLS (Figura 18).

Nuevamente AtHXK1, MdHXK1 y ZmHXK9 presentaron una estructura tridimensional similar, con tres  $\alpha$ -hélices y una región corta desordenada que enlaza a cada una de ellas. ZmHXK5 aparenta ser una HXK muy estructurada ya que parece un continuo de  $\alpha$ -hélices. ZmHXK4 presenta dos  $\alpha$ -hélices, mientras que la HXK que presenta la estructura más desordenada es ZmHXK6.

Es posible que estas diferencias de estructuración puedan llevar a tener una asociación distinta con la membrana externa mitocondrial. Si esto es cierto entonces es posible que ZmHXK6 sea la que se asocie en menor proporción y podría liberarse para moverse al núcleo. Por otra parte, las diferencias en el N-terminal de cada una de las HXKs de maíz podrían indicar una función distinta de las proteínas. Es decir, podrían funcionar como enzima o como sensor de la abundancia de glucosa de acuerdo a las necesidades fisiológicas de la planta en un momento específico.



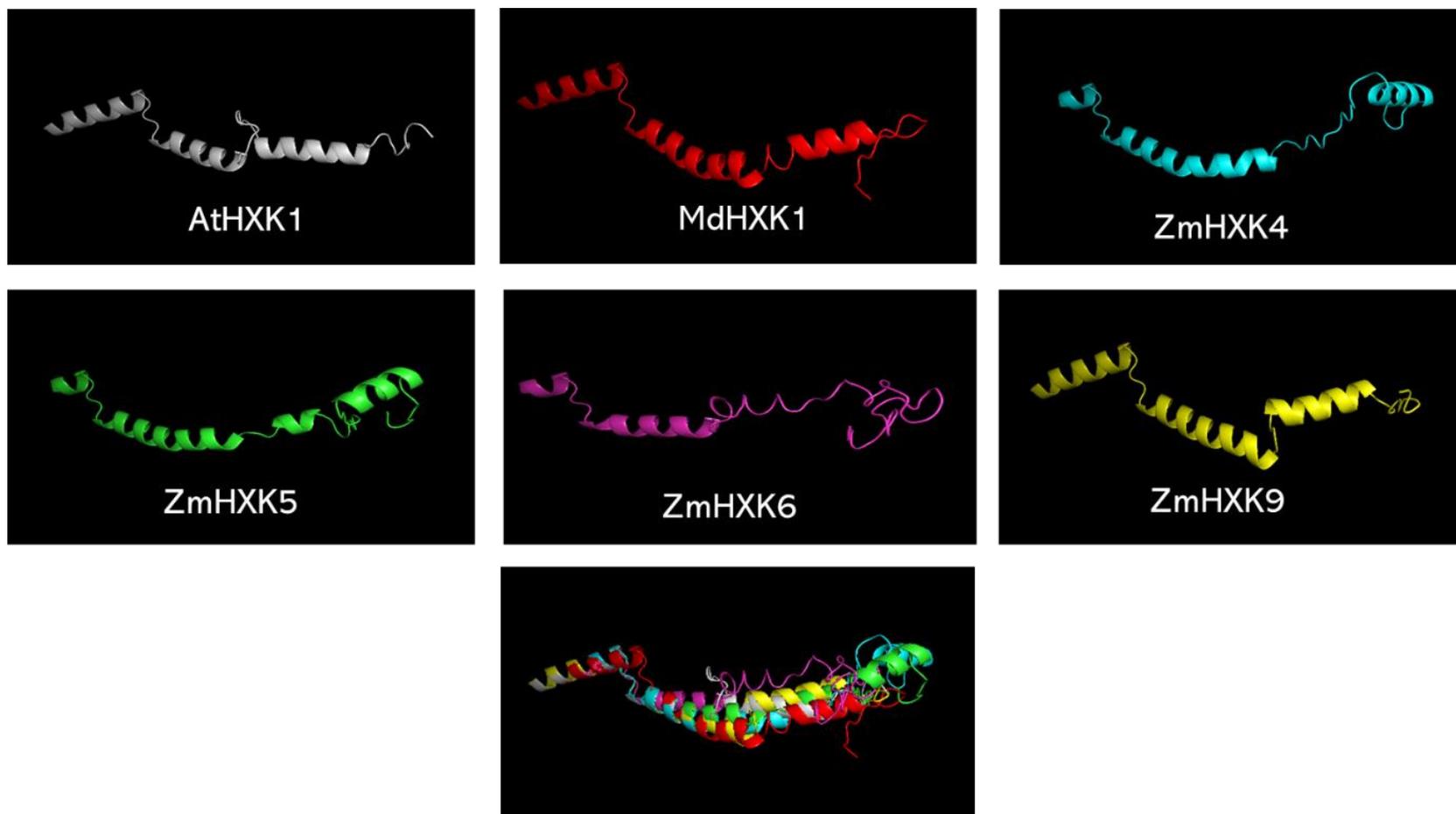
**Figura 18.** Modelo de ZmHXK6 donde se indica la región correspondiente al mTP y a la NLS obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos utilizando el programa I-TASSER.



**Figura 19.** Modelos de las 4 hexocinasas mitocondriales de maíz, la HXK1 de manzana (*Malus domestica*) y la HXK1 de *Arabidopsis thaliana*. Los modelos fueron obtenidos a partir de la secuencia de aminoácidos y con la ayuda del programa I-TASSER.



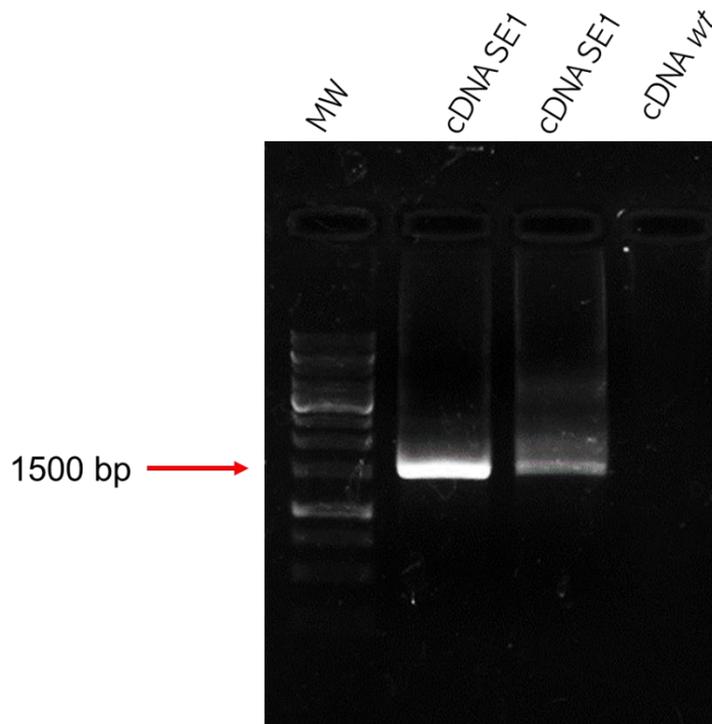
**Figura 20.** Superposición de los modelos tridimensionales propuestos por I-TASSER para AtHXK1 (blanco), MdHXK1 (café) y ZmHXK9 (amarillo).



**Figura 21.** Modelado por I-TASSER de los dominios N-terminal de las hexocinasas de *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* y *Malus domestica*. Se modelaron los 100 primeros aminoácidos de la proteína.

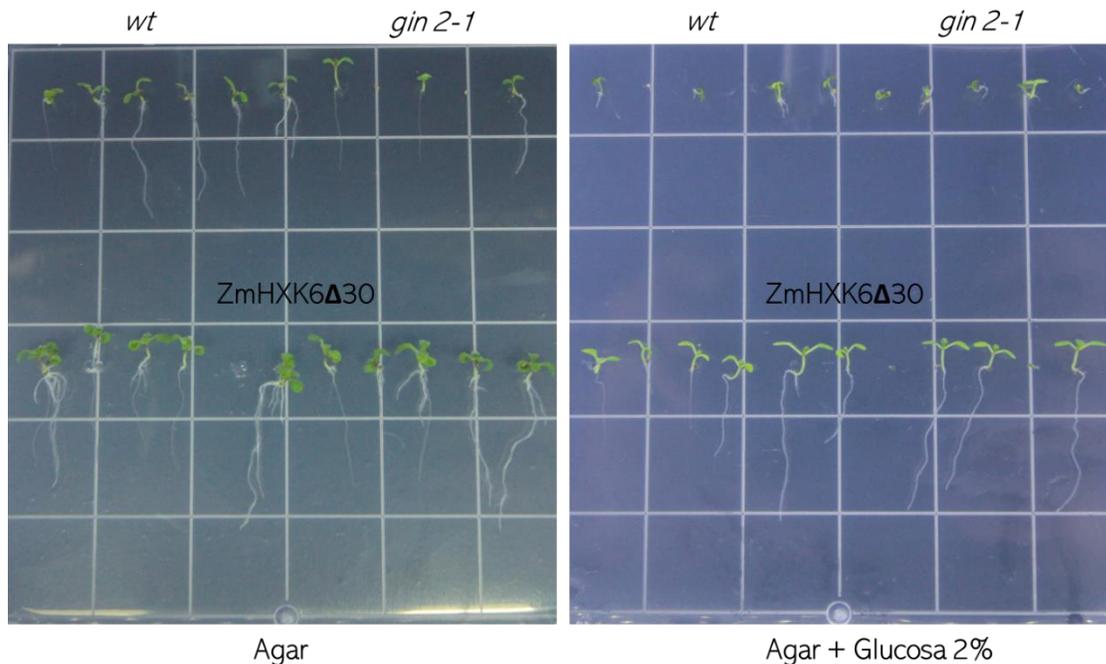
Las plantas de *Arabidopsis* sobreexpresoras de ZmHXK6Δ30 presentan un crecimiento mayor que las plantas de *Arabidopsis* silvestres.

Para estudiar la función de ZmHXK6Δ30, se transformaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Col-0 con el vector pEarlyGate103-ZmHXK6Δ30 que permite su expresión bajo el control del promotor 35S. Las semillas de generación T1 se sembraron en presencia de glufosinato de amonio (BASTA) para la selección. Después se propagaron las plantas hasta obtener la generación T4. Se corroboró la presencia del transgene en la generación T4 mediante PCR (Figura 22).



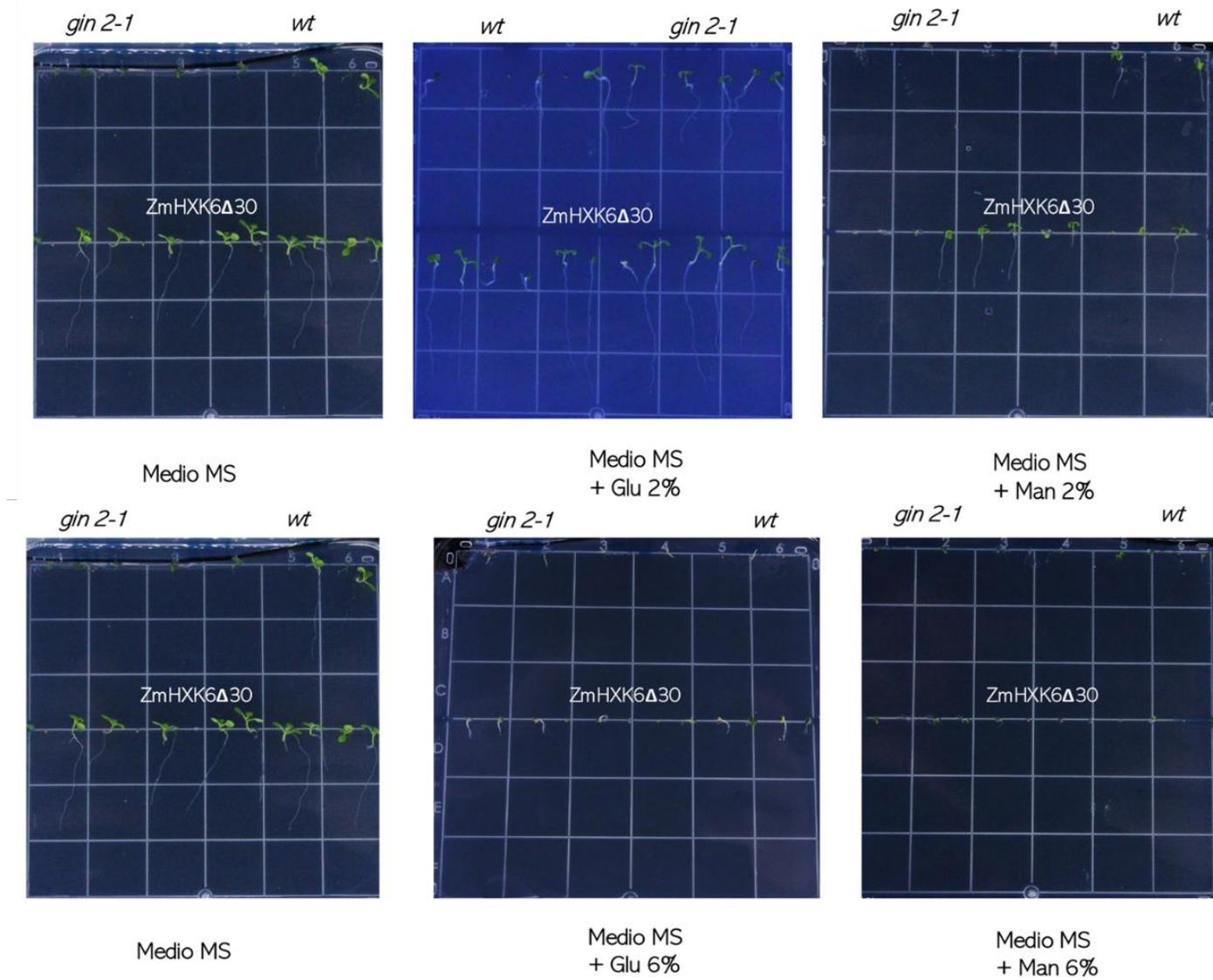
**Figura 22.** Las plantas de *A. thaliana* sobreexpresoras de ZmHXK6Δ30 sí presentan los transcritos para ZmHXK6Δ30. El producto de PCR fue separado en un gel de agarosa 0.7 % y teñido con bromuro de etidio. SE, sobreexpresora; wt, silvestre.

Para evaluar el fenotipo de las plantas sobreexpresoras de ZmHXK6 $\Delta$ 30 se germinaron semillas en medio sólido suplementado con 2 o 6 % de glucosa o manitol (control osmótico). Para determinar el efecto de la sobreexpresión de ZmHXK6 $\Delta$ 30 en las plantas, se comparó su crecimiento con las plantas silvestres y con las mutantes *gin2-1* que carecen de la HXK1.



**Figura 23.** Crecimiento de plantas de *Arabidopsis* silvestres (*wt*), *gin 2-1* y sobreexpresoras de ZmHXK6 $\Delta$ 30 en agar con y sin glucosa.

El fenotipo de las plántulas mutantes *gin2-1* de 7 días crecidas en agar fue similar al de plántulas silvestres, pero las líneas sobreexpresoras presentaron cotiledones más grandes y una arquitectura radical más desarrollada que las otras plantas (Figura 23). En agar suplementado con 2 % de glucosa, las plantas silvestres se desarrollan menos que en ausencia del azúcar (Moore et al., 2003) y las plantas *gin2-1*, crecen un poco mejor que las silvestres en 2 % de Glu (Moore et al., 2003). Aun cuando las plantas sobreexpresoras de ZmHXK6 $\Delta$ 30 crecieron menos en 2 % Glu que en agar, su desarrollo fue superior al de las silvestres y las *gin2-1* (Figura 21).



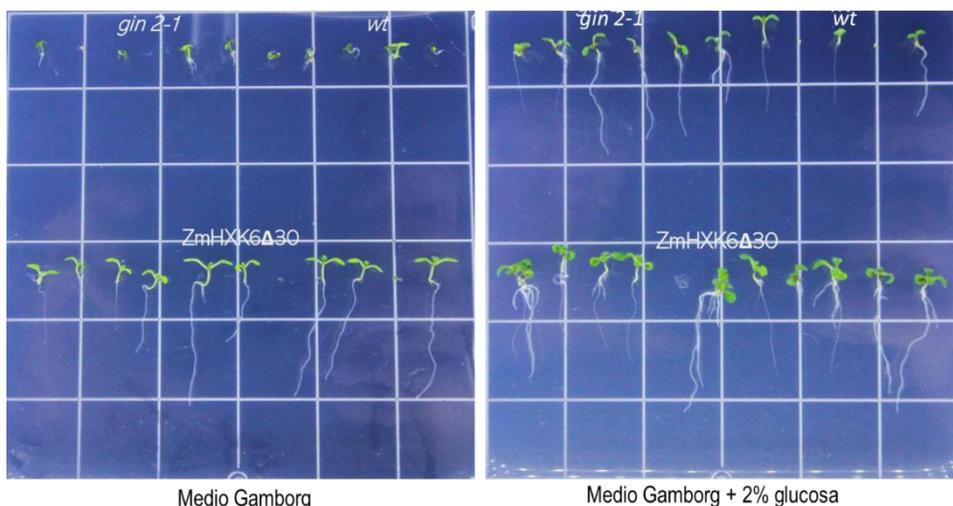
72 **Figura 24.** Crecimiento de plantas de *Arabidopsis silvestris* (wt), *gin 2-1* y sobreexpresoras de *ZmHXK6Δ30* en MS con y sin glucosa, además de la condición control (manitol 2% y 6%).

La capacidad de crecimiento de las plantas está relacionada con la proporción de carbono y nitrógeno que puedan asimilar (Santiago y Tegeder, 2017). Por esta razón se optó por determinar si la adición de sales de amonio modificaba el crecimiento de las plantas sobreexpresoras de ZmH XK6Δ30. Para ello se germinaron y crecieron las plantas en medio MS (Figura 23) y medio Gamborg (Figura 25). Ambos medios tienen añadidas sales, muchas de ellas contribuyendo con nitrógeno al medio, mientras que el medio Gamborg (B5) contiene adicionalmente vitaminas.

En el medio MS sin azúcar añadido se observó que las plantas sobreexpresoras crecieron más que las silvestres y las *gin2-1*. Se observaron los cotiledones expandidos y verdes así como una raíz larga (Figura 24).

Como se esperaba, la adición de glucosa 2% al medio MS reprimió el crecimiento de las plantas silvestres, mientras que las plantas *gin2-1* sí crecieron (Moore et al., 2003). Las plantas sobreexpresoras presentaron un crecimiento mayor, tanto de la parte aérea como de la raíz en condiciones control. A una concentración de glucosa del 6 % se redujo el crecimiento de todas las plantas, pero las sobreexpresoras de ZmH XK6Δ30 fueron las plantas con mayor desarrollo.

En el medio Gamborg (B5) también se encontró que las plantas sobreexpresoras de ZmH XK6Δ30 son las desarrolladas, tanto en presencia de glucosa como en su ausencia (Figura 24). Las plantas silvestres y las mutantes *gin2-1* presentaron un crecimiento similar entre ellas, tanto en presencia como en ausencia de glucosa.



**Figura 25.** Crecimiento de plantas de *Arabidopsis* silvestres (wt), *gin2-1* y sobreexpresoras de ZmH XK6Δ30 en medio Gamborg con y sin glucosa.

## Discusión

*La remoción de la región mTP es la responsable de que ZmHXK6 se encuentre en el núcleo.*

Las HXKs de plantas son proteínas multifacéticas, fosforilan hexosas y proteínas y tienen función sensora (Alvarado-Aguilera y Sánchez-Nieto, 2017; Hu et al., 2016; Sun et al., 2018). Además, pertenecen a familias multigénicas con un número variable de miembros (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017).

La capacidad catalítica de las HXKs de plantas ha sido demostrada experimentalmente en algunas familias, como es el caso de maíz, en donde las seis HXKs predichas como catalíticas efectivamente tienen esa actividad, si bien ZmHXK9 tiene una actividad marginal. Otras características de las HXKs de maíz también han sido exploradas, ZmHXK4, ZmHXK5, ZmHXK6 y ZmHXK9 se asocian a la mitocondria, mientras que ZmHXK7 y ZmHXK8 se encuentran en el citosol. La remoción de los primeros 30 aminoácidos de las ZmHXKs mitocondriales modifica su localización, es decir, ZmHXK4 $\Delta$ 30, ZmHXK5 $\Delta$ 30 y ZmHXK9 $\Delta$ 30 dejan de estar en la mitocondria y se mueven al citoplasma. Mientras que ZmHXK6 $\Delta$ 30 además de presentarse de forma difusa en el citoplasma, forma agregados (Aguilera-Alvarado et al., 2019).

La localización de ZmHXK6 $\Delta$ 30 unida a GFP, podría haberse producido como un artefacto, si bien la ubicación observada difusa y en agregados no ocurrió en las otras enzimas (ZmHXK4 $\Delta$ 30, ZmHXK5 $\Delta$ 30 y ZmHXK9 $\Delta$ 30) a las que se les removieron también los 30 primeros aminoácidos (Aguilera-Alvarado et al., 2019). Se ha reportado que las técnicas de expresión de proteínas de fusión con marcas fluorescentes cada vez son menos utilizadas debido a que la expresión conjunta con la proteína de interés puede modificar el plegamiento y la exposición de sitios necesarios para su correcta localización en un compartimento celular determinado (Thomas y Maule, 2000; Sharma et al., 2018).

Un control que se hizo para determinar si GFP por si sola podía agregarse y dar la localización nuclear fue la expresión de GFP bajo el promotor 35S, encontrándose que GFP se localizaba en el citoplasma (Figura 13), lo que indica que GFP no se agrega, esto descarta que la localización observada en las proteínas de fusión sea debido a la adición de GFP a su secuencia. En el laboratorio también se ha utilizado a GFP unida a otras proteínas, como los transportadores SWEETs y se ha encontrado que la proteína quimérica no formaba agregados y que se localizaba de acuerdo con las características propias de la proteína que se buscaba localizar (López-Coria, comunicación personal).

La formación de agregados de ZmHXK6 $\Delta$ 30 podría indicar una localización nuclear, tal y como se ha demostrado para AtHXK1, OsHXK5 y OsHXK6 (Moore et al., 2003; Cho et al., 2006; Cho et al., 2009). La región removida en ZmHXK6 contiene tanto la secuencia mTP como un par de aminoácidos básicos, estos últimos, de acuerdo con el análisis *in silico* de la secuencia, forman parte de una posible NLS, sugeriendo que su remoción podría ocasionar la formación de agregados en el citoplasma.

El mecanismo de la translocación de las HXKs de la mitocondria a núcleo se desconoce. Sin embargo, se ha demostrado que AtHXK1 se puede encontrar en la mitocondria y en el núcleo, y cuando se encuentra en el núcleo lleva a cabo la función de represión del gen fotosintético *CAB2*. Para lograrlo AtHXK1 interactúa con VHA-B1 y RPT5B y estos últimos a su vez interactúan con dos factores de transcripción (Cho et al., 2009). En *Arabidopsis thaliana*, se han llevado a cabo experimentos de complementación de mutantes *gin2-1* con cada una de las HXKs de maíz sugieren que ZmHXK4 a 9 son HXKs sensoras de altos niveles de glucosa, ya que el crecimiento de estas plantas en 2 % Glu reduce la expresión de *CAB2* (Aguilera-Alvarado, 2019). Adicionalmente, al realizar experimentos de “pull down” usando como carnadas a ZmHXK4 $\Delta$ 30 y ZmHXK6 $\Delta$ 30 inmovilizadas en una resina, por la que se hacen pasar fracciones subcelulares de coleóptilos de maíz, varias proteínas quedan unidas a las HXKs (King-Díaz comunicación personal). Una de ellas es la proteína vacuolar VHA-B1, proteína similar a la que forma parte del complejo que lleva a la represión de *CAB2* en *Arabidopsis thaliana* (Cho et al.,

2009). Por lo que resulta posible que ZmHXK6 $\Delta$ 30 funcione en el núcleo como parte del complejo represor de CAB2 en maíz.

El análisis *in silico* de las ZmHXKs sugiere la presencia de una NLS enseguida de la secuencia mTP en tres HXKs: ZmHXK4, ZmHXK5 y ZmHXK6. Las posibles NLS son similares a las que presentan OsHXK5 y OsHXK6 (Cho et al., 2006), lo cual es indicativo de que las tres proteínas de maíz podrían encontrarse en el núcleo. Debido a que se desconoce cuál es el mecanismo que lleva a estas proteínas al núcleo, se examinó como primera aproximación la localización de ZmHXK6 cuando ha perdido la NLS. Aunque, también se pretendían examinar a las otras dos HXKs que tienen una secuencia de posible NLS, no fue posible clonarlas, probablemente por un diseño inadecuado de los oligonucleótidos o a que las condiciones de la PCR no fueron las apropiadas.

La producción y expresión de las diferentes versiones truncas como ZmHXK6 $\Delta$ 30, ZmHXK6 $\Delta$ mTP, ZmHXK6 $\Delta$ NLS1 y ZmHXK6 $\Delta$ NLS2 todas fusionadas a GFP en un sistema de plantas tanto heterólogo (protoplastos *A. thaliana*) como homólogo (protoplastos de *Zea mays*) demostraron que la sola pérdida de la mTP lleva a que la proteína se localice en el núcleo. En el trabajo que demuestra la presencia en el núcleo de las HXKs de arroz, los autores produjeron una versión de NLS unida a GFP y observaron que la GFP se encontraba en el núcleo (Cho et al., 2006). Sin embargo, ellos no probaron la localización de la proteína luego de la remoción de la mTP, como se hizo en este trabajo. Por lo que se hace necesario hacer el estudio de la función de la posible NLS encontrada en maíz, lo que ayudaría a explicar si la NLS es funcional.

El modelado *in silico* del arreglo espacial de la región N-terminal de las HXKs mitocondriales de maíz muestra diferencias grandes en su plegamiento. ZmHXK6 es la que posee una región más desordenada que ZmHXK4, ZmHXK5 y ZmHXK9, ya que para ellas se predicen hélices alfa muy definidas que podrían ayudar a interactuar a estas proteínas con mayor fuerza a la membrana externa mitocondrial, lo que posiblemente complicaría su cambio de localización y restringiría su movimiento. Basado en lo anterior ZmHXK6 podría ser un buen candidato para

movilizarse más prontamente de la mitocondria al núcleo o que esa característica de poca estructuración podría darle *in vivo* características de actividad distintas a las otras ZmHXKs mitocondriales. Lo anterior se sugiere ya que la complementación de levaduras con las versiones truncas de ZmHXK4, 5 y 6 crecen a diluciones menores que la complementación con las versiones completas de estas enzimas (Aguilera-Alvarado et al., 2019).

Por otra parte, la estructuración de la proteína en su región N-terminal podría no ser parte importante del proceso de señalización de azúcares, ya que AtHXK1 y MdHXK1, tienen una región N-terminal bastante estructurada y similar a las otras versiones mitocondriales y a pesar de ello han sido descritas a detalle como proteínas que participan en la señalización (Cho et al., 2006; Hu et al., 2016; Sun et al., 2018).

Respecto al análisis *in silico*, solo resta mencionar que ZmHXK9 es la proteína que tiene un parecido estructural más cercano a AtHXK1 y MdHXK1, según lo que observamos en este trabajo, aunque tiene una actividad marginal demostrada tanto como proteína recombinante producida en *E. coli* como medida en levaduras (Aguilera-Alvarado et al., 2019), por lo que sería interesante determinar su capacidad como proteína sensora y/o llevar a cabo la cristalización de la proteína junto con alguna otra HXK de maíz y la de *Arabidopsis* para determinar si realmente tienen estructuras distintas.

#### *ZmHXK6 es una proteína con posible localización dual.*

Los resultados de este trabajo apuntan a que ZmHXK6 es una proteína que tiene la capacidad de encontrarse en dos organelos, la mitocondria y el núcleo. Se han reportado proteínas con características “moonlighting” o multifuncional que pueden encontrarse en dos organelos, llevando a cabo funciones distintas, como por ejemplo, las proteínas que integran la cristalina del lente ocular de aves como el pato, el ganso y el cisne (Zwicke et al., 2014), las cuales se presentan en un organelo distinto con una función completamente diferente.

El primer reporte en plantas de proteínas con localización subcelular dual fue en 1995, cuando Creissen encontró que la glutatión reductasa de chícharo posee un péptido que la dirige hacia mitocondria o cloroplasto, desde entonces se han caracterizado más de 250 proteínas con la capacidad de encontrarse en dos sitios en la célula (Carrie y Whelan, 2013). Hay al menos 100 proteínas que al igual que la glutatión reductasa de chícharo, se encuentran en mitocondria y cloroplasto (Carrie y Small, 2013). La doble localización de esta proteína además está conservada, puesto que ahora se sabe que en *A. thaliana*, *O. sativa* y *P. patens* también se presenta en dos compartimentos celulares distintos (Carrie y Whelan, 2013).

El porqué de la existencia de estas proteínas ha sido discutido, y se hipotetizan distintas teorías, una de ellas es que su presencia dota a la planta de una ventaja selectiva. Otra posible razón, es que es energéticamente menos costoso debido a que se necesita menos energía y esfuerzo por parte de la célula para mantener su genoma. Una propuesta alterna es la que sugiere que la capacidad de tener a la misma enzima en dos organelos permite a la planta mover vías metabólicas completas de un organelo a otro, o permite la comunicación por medio de la señalización entre varios organelos (Carrie y Whelan, 2013).

Una propuesta interesante de cómo percibir el estado metabólico de la célula, es la señalización o comunicación del estado metabólico a través de mover una proteína desde el organelo maestro en la síntesis de ATP, la mitocondria, hacia el núcleo. Así, una HXK que es capaz de percibir las altas concentraciones de glucosa en la mitocondria y traducirlo en la represión de genes fotosintéticos al translocarse al núcleo podría ser una ventaja para percibir y transducir rápidamente la información. Aunque se desconoce el mecanismo de translocación.

Respecto a las señales que puede recibir la mitocondria y transducirlas al núcleo, están aquellas que ocurren ante el ataque por un patógeno y en un estrés por especies reactivas de oxígeno, en donde se han encontrado proteínas mitocondriales que poseen una función distinta al ser movilizadas al núcleo, la mayoría de ellas actuando como factores transcripcionales (Duchêne y Giegé,

2012). Tal es el caso de AtAPL, un factor transcripcional APL y AtPNMI una proteína con pentatricopéptidos repetidos y que tienen una función desconocida en la mitocondria, pero que en el núcleo la primera actúa como un factor de transcripción y la segunda como regulador negativo de la expresión génica (Carrie, Giraud, y Whelan, 2009; Hammani et al., 2011).

Así las células tienen muchas proteínas con dos posibilidades de localización, lo que hace necesario un sistema para regular la llegada de la proteína al organelo blanco. Se ha demostrado que la cantidad de proteína en los dos organelos blanco varía, normalmente una localización es preferida sobre la otra (Regev-Rudzki, et al., 2007). Sin embargo, es notable que esta distribución pueda cambiar de acuerdo con las condiciones metabólicas a las que está sometida la planta (Regev-Rudzki et al., 2009).

Otro ejemplo de proteína con localización mitocondrial y nuclear es la DNA ligasa 1 de *A. thaliana* (AtLIG1) que posee tanto una NLS como una secuencia mTP. Sin embargo, existe una relación jerárquica entre éstas dos señales, siendo la secuencia mTP la que tiene un mayor peso al momento de dictar la localización de la proteína (Sunderland et al., 2006). Al parecer algo similar sucede con ZmHXK6, ya que solo al remover a la mTP se observa en el núcleo.

El mecanismo por el cual AtLIG1 se localiza en uno u otro organelo tiene que ver con la transcripción de su mRNA, ya que se localizaron tres codones de inicio en su secuencia de nucleótidos, lo que permite llevar a cabo una transcripción selectiva: si se transcribe desde el primer codón de inicio se produce la proteína completa que va a la mitocondria, si se hace desde el segundo codón la proteína se localiza exclusivamente en el núcleo (Sunderland et al., 2006). Este resultado demuestra que la presencia de mTP dirige a la proteína a la mitocondria, incluso si también el NLS está presente y funcional, es decir, el mTP es jerárquicamente más importante que el NLS (Regev-Rudzki, et al., 2007).

Cuando se expresa una proteína en un sistema heterólogo, se podría tener como desventaja que no se encuentren los procesos o el mecanismo que regula su plegamiento o que la lleve a localizarse en el lugar adecuado. La complementación de levaduras con ZmHXK6 y ZmHXK6 $\Delta$ 30 mostró que la proteína se encuentra altamente expresada pero en toda la célula, lo que sugiere que el mecanismo que lleva a que la proteína localice en un lugar preferencial no se encuentra en la levadura, sea un mecanismo genético y/o protéico.

Por otra parte, también hay que considerar la posibilidad la NLS sea inaccesible, cuando el mTP se encuentra interactuando con la membrana externa mitocondrial. Un posible mecanismo que puede romper la asociación de la proteína con la membrana externa mitocondrial es la proteólisis de la mTP. Se ha demostrado que proteínas que contienen motivos de dos argininas consecutivas (-RR-) pueden ser blanco de proteasas específicas (Magni et al., 2012). En la región N-terminal de las HXKs seguido de la mTP hay varias argininas, lo que podría sugerir que este mecanismo es factible y responsable de la translocación de la proteína al núcleo.

Como ya se mencionó ZmHXK6 contiene una mTP antes de la secuencia bipartita de NLS, es posible que la liberación de la mTP ocurra a través de un corte proteólico antes de la NLS o dentro de la primera o hasta la segunda secuencia de aminoácidos básicos que la conforman, para ello tendrían que encontrarse proteasas específicas, tal vez a través de obtener extractos mitocondriales o bien citosólicos y colocarlos en presencia de la proteína completa purificada.

En *Lupinus albus* hay proteínas que presentan motivos básicos que son reconocidos por proteasas específicas. La función de la proteasa es acelerar la degradación de las proteínas durante la germinación, así como generar polipéptidos con actividad biológica específica de acuerdo al estadio de maduración de la semilla (Magni et al., 2012). Los motivos compuestos por parejas de aminoácidos básicos se han encontrado relacionados con la conversión de proteínas pre-hormonas a hormonas maduras y activas, así como la activación de zimógeno, como es el caso de la insulina y la renina (Becker, 2001). Además, se ha relacionado a los motivos con

argininas consecutivas a la translocación de proteínas plegadas en algunos procariontes (Kwan y Bolhuis, 2010).

En resumen, ZmHXK6 puede encontrarse en dos organelos, aunque al parecer solo en plantas se encuentra el mecanismo para que esta translocación ocurra. El mecanismo para llevar a la proteína de la mitocondria al núcleo aún se desconoce, un candidato que podría ser interesante de investigar es la presencia de proteasas específicas.

#### La sobreexpresión de ZmHXK6 $\Delta$ 30 mejora el crecimiento de la planta de *Arabidopsis* y reduce su sensibilidad a glucosa.

Al ser la primera enzima intracelular que usa como sustrato a la glucosa, la hexocinasa puede mejorar el uso de los azúcares para la formación de biomasa, pensando en ello se produjeron plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan a ZmHXK6 $\Delta$ 30 de manera estable. Las mutantes se crecieron en diferentes medios, agar solo, o suplementado con sales nitrogenadas y/o vitaminas. Las plantas presentaron un crecimiento mayor al de las plantas silvestres y fueron insensibles al crecimiento en glucosa, aún más insensibles que las mutantes *gin2-1*.

Este fenotipo de alto crecimiento de las plantas sobreexpresoras de la versión trunca de ZmHXK6 se puede atribuir a una mayor eficiencia metabólica, que provoca que la planta utilice mejor los nutrientes y crezca más rápido, o a una desregulación metabólica que provoca que aún en condiciones de alto contenido de glucosa, crezca más que las plantas silvestres y las mutantes que carecen de AtHXK1 (mutantes *gin2-1*). Cuando las plantas crecieron en presencia de sales de amonio, medio MS o Gamborg, se observó que las plantas sobreexpresoras de HXK crecían aún mejor, lo cual puede atribuirse a un mejor uso de los recursos, ya que la planta necesita para crecer no solo carbono sino también nitrógeno, para producir más proteínas, para replicarse y producir más biomasa (Coruzzi y Zhou, 2001).

La abundancia en el contenido de glucosa es percibida por la HXK para reducir la tasa fotosintética, lo que hace que las plantas silvestres reduzcan su crecimiento en

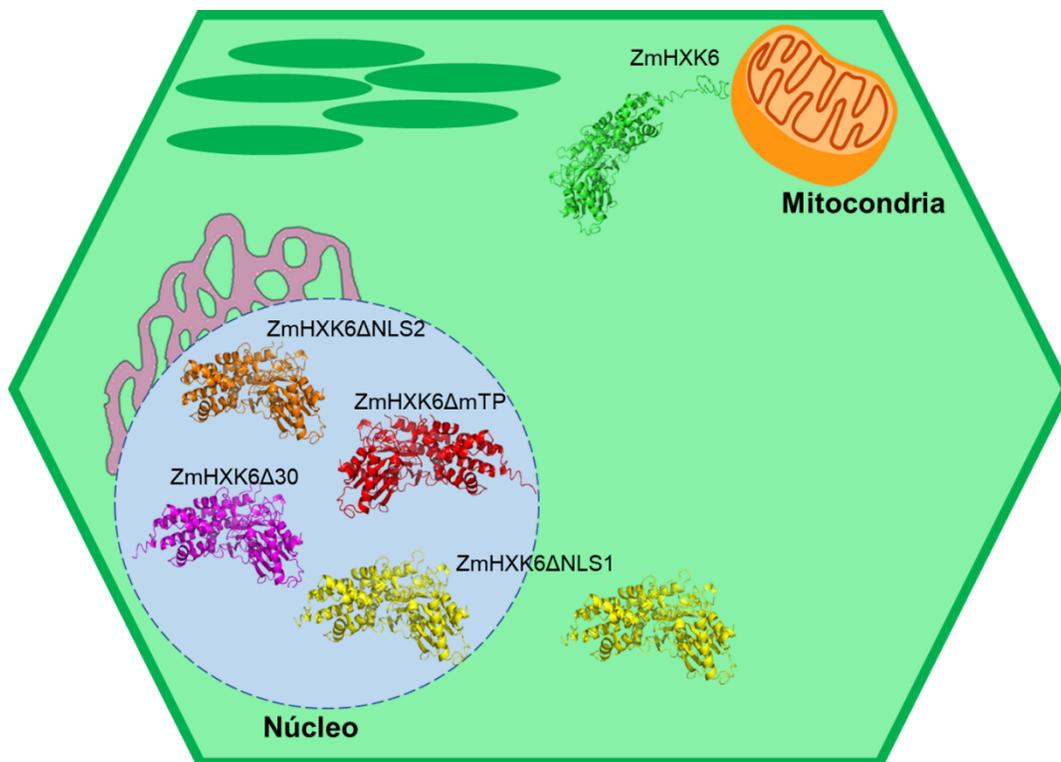
esa condición. Sin embargo, las plantas sobreexpresoras muestran poca sensibilidad a la adición de glucosa al medio, ya que siguen creciendo. Se hace necesario examinar qué ocurre con los genes fotosintéticos, cuánta glucosa-6P se está produciendo en estas plantas y si la ausencia de la región N-terminal, es la que tiene que ver con esta insensibilidad a la glucosa.

El análisis aquí realizado fue exploratorio para determinar si las plantas que sobreexpresan a una HXK presentaban fenotipos distintos a las silvestres. Se encontró que sí, son distintos y al parecer le beneficia a la planta en tiempos cortos del crecimiento, lo cual puede ser usado con fines biotecnológicos. Sin embargo, faltan muchos aspectos por explorar, por ejemplo, determinar si se persiste a tiempos prolongados la mejora en el crecimiento y también si hay alguna otra ventaja de sobreexpresar a esta proteína. Por ejemplo, determinar si las plantas sobreexpresoras de la HXK responden mejor a condiciones de estrés. Así como registrar los fenotipos de plantas sobreexpresoras de las diferentes versiones truncas y la versión completa de ZmHXK6.

## Conclusiones

La remoción de la región N-terminal que funciona como péptido de anclaje a la mitocondria en ZmHXK6 relocaliza a la proteína al núcleo, mediante un mecanismo exclusivo de plantas e independiente de la integridad de la posible NLS contenida en la secuencia.

La sobreexpresión de ZmHXK6 $\Delta$ 30 en *A. thaliana* altera el desarrollo de la planta en etapas tempranas, aumentando su tamaño y tasa de crecimiento, posiblemente debido a una mayor eficiencia metabólica.



**Figura 26.** Resumen de los resultados de la localización de las versiones truncas dentro de la célula. Donde la versión completa (verde) se encontró en la mitocondria, en tanto que todas las versiones truncas tuvieron una localización nuclear, siendo ZmHXK6 $\Delta$ NLS1 la única que se observó además en el citoplasma. ZmHXK6, Verde; ZmHXK6 $\Delta$ mTP, Rojo; ZmHXK6 $\Delta$ 30, morado; ZmHXK6 $\Delta$ NLS1, Amarillo; ZmHXK6 $\Delta$ NLS2, Anaranjado.

## Perspectivas

- Mejorar la microscopía.
- Determinar si la NLS es capaz de movilizar a una proteína distinta a la HXK hacia el núcleo.
- Identificar la existencia de proteasas en los extractos de mitocondrias citosol que lleven a la degradación de la región amino terminal de la ZmHXK6.
- Determinar si alguna de las ZmHXKs citosólicas (ZmHXK7 y ZmHXK8) también son capaces de interactuar con las proteínas que forman el complejo represor de *CAB2*.
- Estudiar el efecto de las versiones trucas de ZmHXK6 en el fenotipo y función señalizadora en las plantas de *Arabidopsis* complementadas y sobreexpresoras.
- Cristalizar a las diferentes HXKs mitocondriales y examinar si efectivamente existen diferencias en su plegamiento.

## Referencias

- Aguilera-Alvarado, Giovanna P. y Sánchez-Nieto, S. (2017). Plant hexokinases are multifaceted proteins. *Plant and Cell Physiology*, 58(7), 1151–1160. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcx062>
- Aguilera-Alvarado, Giovanna P., Guevara-García, Á. A., Estrada-Antolín, S. A. y Sánchez-Nieto, S. (2019). Biochemical properties and subcellular localization of six members of the HXK family in maize and its metabolic contribution to embryo germination. *BMC Plant Biology*, 19(27), 1–18.
- Alcántar-Aguirre, F. C., Chagolla, A., Tiessen, A., Délano, J. P. y González de la Vara, L. E. (2013). ATP produced by oxidative phosphorylation is channeled toward hexokinase bound to mitochondrial porin (VDAC) in beetroots (*Beta vulgaris*). *Planta*, 237(6), 1571–1583. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1866-4>
- Arora, K. K., Filburns, C. R., y Pedersen, P. L. (1993). Structure/function relationships in hexokinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(24), 18259–18266.
- Ben-Menachem, R., Tal, M., Shadur, T., y Pines, O. (2011). A third of the yeast mitochondrial proteome is dual localized: A question of evolution. *Proteomics*, 11(23), 4468–4476. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100199>
- Brameier, M., Krings, A., y MacCallum, R. M. (2007). NucPred - Predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics*, 23(9), 1159–1160. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm066>
- Brenner, D., y Mak, T. W. (2009). Mitochondrial cell death effectors. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.004>
- Brown, K. S., Kalinowski, S. S., Megill, J. R., Durham, S. K., y Mookhtiar, K. A. (1997). Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus. *Diabetes*, 46(2), 179–186. <https://doi.org/10.2337/diab.46.2.179>
- Carrie, Chris, Giraud, E., y Whelan, J. (2009). Protein transport in organelles: Dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Journal*, 276(5), 1187–1195. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06876.x>
- Carrie, Chris, y Whelan, J. (2013). Widespread dual targeting of proteins in land plants: When, where, how and why. *Plant Signaling y Behavior*, (August), 1–13.
- Carrie, Christopher, y Small, I. (2013). A reevaluation of dual-targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(2), 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.029>
- Chen, C., Zabad, S., Liu, H., Wang, W. y Jeffery, C. (2018). MoonProt 2.0: An expansion and update of the moonlighting proteins database. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D640–D644. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1043>
- Cho, J. I., Ryoo, N., Hahn, T. R., Jeon, J. S. (2009). Evidence for a role of hexokinases as conserved glucose sensors in both monocot and dicot plant species. *Plant signaling y behavior*, 4(9), 908–910. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131227>
- Cho, J.-I., Ryoo, N., Eom, J.-S., Lee, D.-W., Kim, H.-B., Jeong, S.-W., Jeon, J.-S. (2009). Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. *Plant physiology*, 149(2), 745–759. <https://doi.org/10.1104/pp.108.131227>

- Cho, J.-I., Ryoo, N., Ko, S., Lee, S.-K., Lee, J., Jung, K.-H., Jeon, J.-S. (2006). Structure, expression, and functional analysis of the hexokinase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 224(3), 598–611. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0251-y>
- Cho, Y.-H., Yoo, S.-D., y Sheen, J. (2006). Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127(3), 579–589. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.028>
- Coruzzi, G. M., y Zhou, L. (2001). Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: Emerging “matrix effects”. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(3), 247–253. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00168-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00168-0)
- Dai, Nir; German, Marcelo A.; Matsevitz, Tania; Hanael, Rana; Swartzberg, Dvora; Yeselson, Yelena; Petreikov, Marina; Schaffer, Arthur A.; Granot, D. (2002). LeFRK2, the gene encoding the major fructokinase in tomato fruits, is not required for starch biosynthesis in developing fruits. *Plant Science*, 162(3), 423–430. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00583-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00583-0)
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C. y Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 15(10), 573–581. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.005>
- Duchêne, A.-M. y Giegé, P. (2012). Dual localized mitochondrial and nuclear proteins as gene expression regulators in plants? *Frontiers in Plant Science*, 3(September), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00221>
- Feng, J., Zhao, S., Chen, X., Wang, W., Dong, W., Chen, J. y Kuang, T. (2015). Biochemical and structural study of *Arabidopsis* hexokinase 1. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 71(February), 367–375. <https://doi.org/10.1107/S1399004714026091>
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., y Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- Gorlich, D. (1997). Nuclear protein import. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(3), 412–419.
- Granot, D., David-Schwartz, R., y Kelly, G. (2013). Hexose Kinases and Their Role in Sugar-Sensing and Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, 4(March), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00044>
- Hammani, K., Des Francs-Small, C. C., Takenaka, M., Tanz, S. K., Okuda, K., Shikanai, T. y Small, I. (2011). The pentatricopeptide repeat protein OTP87 is essential for RNA editing of *nad7* and *atp1* transcripts in *Arabidopsis* mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21361–21371. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230516>
- He, C., Chen, J., Wang, H., Wan, Y., Zhou, J., Dan, Z., ... Yin, L. (2019). Crystal structures of rice hexokinase 6 with a series of substrates shed light on its enzymatic mechanism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.05.139>
- Hu, D. G., Sun, C. H., Zhang, Q. Y., An, J. P., You, C. X., y Hao, Y. J. (2016). Glucose Sensor MdHXK1 Phosphorylates and Stabilizes MdbHLH3 to Promote Anthocyanin Biosynthesis in Apple. *PLoS Genetics*, 12(8), 215–221. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006273>
- Huberts, D. H. E. W., y van der Klei, I. J. (2010). Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1803(4), 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.022>

- Jang, J. C., León, P., Zhou, L., y Sheen, J. (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant cell*, 9(1), 5–19. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.1.5>
- Jeffery, C. J. (2017). Protein moonlighting: what is it, and why is it important? *Philosophical transactions B*, 373(11), 308–313. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0523>
- Karve, A., Rauh, B. L., Xia, X., Kandasamy, M., Meagher, R. B., Sheen, J., y Moore, B. d. (2008). Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in *Arabidopsis*. *Planta*, 228(3), 411–425. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0746-9>
- Karve, A., Xia, X., y Moore, B. d. (2012). *Arabidopsis* Hexokinase-Like1 and Hexokinase1 form a critical node in mediating plant glucose and ethylene responses. *Plant physiology*, 158(4), 1965–1975. <https://doi.org/10.1104/pp.112.195636>
- Karve, R., Lauria, M., Virnig, A., Xia, X., Rauh, B. L., y Moore, B. D. (2010). Evolutionary lineages and functional diversification of plant hexokinases. *Molecular Plant*, 3(2), 334–346. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq003>
- Kim, H. B., Cho, J. Il, Ryoo, N., Shin, D. H., Park, Y. Il, Hwang, Y. S. y Jeon, J. S. (2016). Role of rice cytosolic hexokinase OsHKK7 in sugar signaling and metabolism. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(2), 127–135. <https://doi.org/10.1111/jipb.12366>
- Kim, M., Lim, J.-H., Ahn, C. S., Park, K., Kim, G. T., Kim, W. T., y Pai, H.-S. (2006). Mitochondria-associated hexokinases play a role in the control of programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, 18(9), 2341–2355. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041509>
- Kisslov, I., Naamati, A., Shakarchy, N., y Pines, O. (2014). Dual-targeted proteins tend to be more evolutionarily conserved. *Molecular Biology and Evolution*, 31(10), 2770–2779. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu221>
- Koch, K. E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 47, 509–540. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.509>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Matsumura, N., Takashima, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M., y Yanagawa, H. (2009). Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin. *Journal of Biological Chemistry*, 284(1), 478–485. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807017200>
- Kraakman, L. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M., y Winder, J. H. DE. (1999). Structure–function analysis of yeast hexokinase: structural requirements for triggering cAMP signalling and catabolite repression. *Biochemical Journal*, 343(1), 159–168. <https://doi.org/10.1042/bj3430159>
- Kuser, P. R., Krauchenco, S., Antunes, O. A. C., y Polikarpov, I. (2000). The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20814–20821. <https://doi.org/10.1074/jbc.M910412199>
- Kwan, D., y Bolhuis, A. (2010). Analysis of the twin-arginine motif of a haloarchaeal Tat substrate. *FEMS Microbiology Letters*, 308(2), 138–143. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02001>
- Li, N. na, Qian, W. jun, Wang, L., Cao, H. li, Hao, X. yuan, Yang, Y. jun, y Wang, X. chao. (2017). Isolation and expression features of hexose kinase genes under various abiotic stresses in the tea plant (*Camellia sinensis*). *Journal of Plant Physiology*, 209, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.11.007>

- Magni, C., Sessa, F., Tedeschi, G., Negri, A., Scarafoni, A., Consonni, A., y Duranti, M. (2012). Identification in lupin seed of a serine-endopeptidase activity cleaving between twin arginine pairs and causing limited proteolysis of seed storage proteins. *Molecular Plant*, 5(5), 1011–1019. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr116>
- Marfori, M., Mynott, A., Ellis, J. J., Mehdi, A. M., Saunders, N. F. W., Curmi, P. M. y Kobe, B. (2011). Molecular basis for specificity of nuclear import and prediction of nuclear localization. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(9), 1562–1577. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.013>
- Moore, B. (2003). Role of the *Arabidopsis* glucose sensor hxk1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300(5617), 332–336. <https://doi.org/10.1126/science.1080585>
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 474–497.
- Nguyen Ba, A. N., Pogoutse, A., Provard, N., y Moses, A. M. (2009). NLStradamus: A simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. *BMC Bioinformatics*, 10, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-202>
- Nilsson, A., Olsson, T., Ulfstedt, M., Thelander, M., y Ronne, H. (2011). Two novel types of hexokinases in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC plant biology*, 11(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-32>
- Olsson, T., Thelander, M., y Ronne, H. (2003). A Novel Type of Chloroplast Stromal Hexokinase Is the Major Glucose-phosphorylating Enzyme in the Moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44439–44447. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306265200>
- Pastorino, J. G., y Hoek, J. B. (2008). Regulation of hexokinase binding to VDAC. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(3), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9148-8>
- Piatigorsky, J., y Wistow, G. J. (1989). Enzyme/crystallins: Gene sharing as an evolutionary strategy. *Cell*, 57(2), 197–199. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90956-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90956-2)
- Portugal, J., y Waring, M. J. (1988). Assignment of D N A binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 949, 158–168.
- Price, J. (2003). Mechanisms of Glucose Signaling during Germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132(3), 1424–1438. <https://doi.org/10.1104/pp.103.020347>
- Price, John, Laxmi, A., St Martin, S. K., y Jang, J.-C. (2004). Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 16(8), 2128–2150. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022616>
- Regev-Rudzki, N., Naamati, A., Lill, R., Pines, O., y Galperin, S. (2009). Dual targeting of Nfs1 and discovery of its novel processing enzyme, lcp55. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44), 30200–30208. <https://doi.org/10.1074/jbc.m109.034694>
- Santiago, J. P., y Tegeder, M. (2017). Implications of nitrogen phloem loading for carbon metabolism and transport during *Arabidopsis* development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 59(6), 409–421. <https://doi.org/10.1111/jipb.12533>

- Sharma, M., Kretschmer, C., Lampe, C., y Stuttmann, J. (2018). Determining targeting specificity of nuclear-encoded organelle proteins with the self-assembling split fluorescent protein toolkit, (12), 1–29. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1101/480962>
- Sperschneider, J., Catanzariti, A. M., Deboer, K., Petre, B., Gardiner, D. M., Singh, K. B. y Taylor, J. M. (2017). LOCALIZER: Subcellular localization prediction of both plant and effector proteins in the plant cell. *Scientific Reports*, 7(March), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep44598>
- Stewart, M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3), 195–208. <https://doi.org/10.1038/nrm2114>
- Sun, M.-H., Ma, Q., Hu, D.-G., Zhu, X.-P., You, C., Shu, H.-R., y Hao, Y.-J. (2018). The glucose sensor MdHXK1 phosphorylates a tonoplast Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger to improve salt tolerance. *Plant Physiology*, 176(April), pp.01472.2017. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01472>
- Sunderland, P. A., West, C. E., Waterworth, W. M., y Bray, C. M. (2006). An evolutionarily conserved translation initiation mechanism regulates nuclear or mitochondrial targeting of DNA ligase 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 47(3), 356–367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02791.x>
- Thomas, C. L., y Maule, A. J. (2000). Limitations on the use of fused green fluorescent protein to investigate structure-function relationships for the cauliflower mosaic virus movement protein. *Journal of General Virology*, 81(7), 1851–1855. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-7-1851>
- Trottas, E., Ambrosio, D., Grossos, N. Del, Ravagnans, G., Cirillin, M., y Paci, M. (1993). HNMR study of [ D ( GCGATCGC ) i2 and its interaction with minor groove binding 4', 6-diamidino-2-phenylindole. *Biochemistry*, 268(6), 3944–3951.
- Van Schaftingen, E. (2013). *Hexokinase/Glucokinase*. *Encyclopedia of Biological Chemistry* (2a ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00073-6>
- Villadsen, D., y Smith, S. M. (2004). Identification of more than 200 glucose-responsive *Arabidopsis* genes none of which responds to 3-O-methylglucose or 6-deoxyglucose. *Plant Molecular Biology*, 55(4), 467–477. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-1050-0>
- Wang, X. Q., Li, L. M., Yang, P. P., y Gong, C. L. (2014). The role of hexokinases from grape berries (*Vitis vinifera* L.) in regulating the expression of cell wall invertase and sucrose synthase genes. *Plant Cell Reports*, 33(2), 337–347. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1533-z>
- Wilson, J. E. (2003). Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *Journal of Experimental Biology*, 206(Pt 12), 2049–2057. <https://doi.org/10.1242/jeb.00241>
- Wlodkowic, D., Skommer, J., Hillier, C., y Darzynkiewicz, Z. (2008). Multiparameter detection of apoptosis using red-excitable SYTO probes. *Cytometry Part A*, 73(6), 563–569. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20564>
- Xiao, W., Sheen, J., y Jang, J. (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction, 451–461.
- Yoo, S. D., Cho, Y. H., y Sheen, J. (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2(7), 1565–1572. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>

- Yoshida, H., Hirano, K., Sato, T., Mitsuda, N., Nomoto, M., Maeo, K. y Ueguchi-Tanaka, M. (2014). DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the INDETERMINATE DOMAIN family proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(21), 7861–7866. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321669111>
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., y Chua, N. H. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols*, 1(2), 641–646. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.97>
- Zhang, Z. W., Yuan, S., Xu, F., Yang, H., Zhang, N. H., Cheng, J., y Lin, H. H. (2010). The plastid hexokinase pHXK: A node of convergence for sugar and plastid signals in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 584(16), 3573–3579. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.024>
- Zhao, J., Sun, M., Hu, D., y Hao, Y. (2016). Molecular cloning and expression analysis of a hexokinase gene, *mdhvk1* in apple. *Horticultural Plant Journal*, 2(2), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2016.06.005>
- Zwicke, G., Amblee, V., Mani, M., Patel, B., Jeffery, C. J., Chen, C., y Zabad, S. (2014). MoonProt: a database for proteins that are known to moonlight. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D277–D282. <https://doi.org/10.1093/nar/gku954>

## Anexos

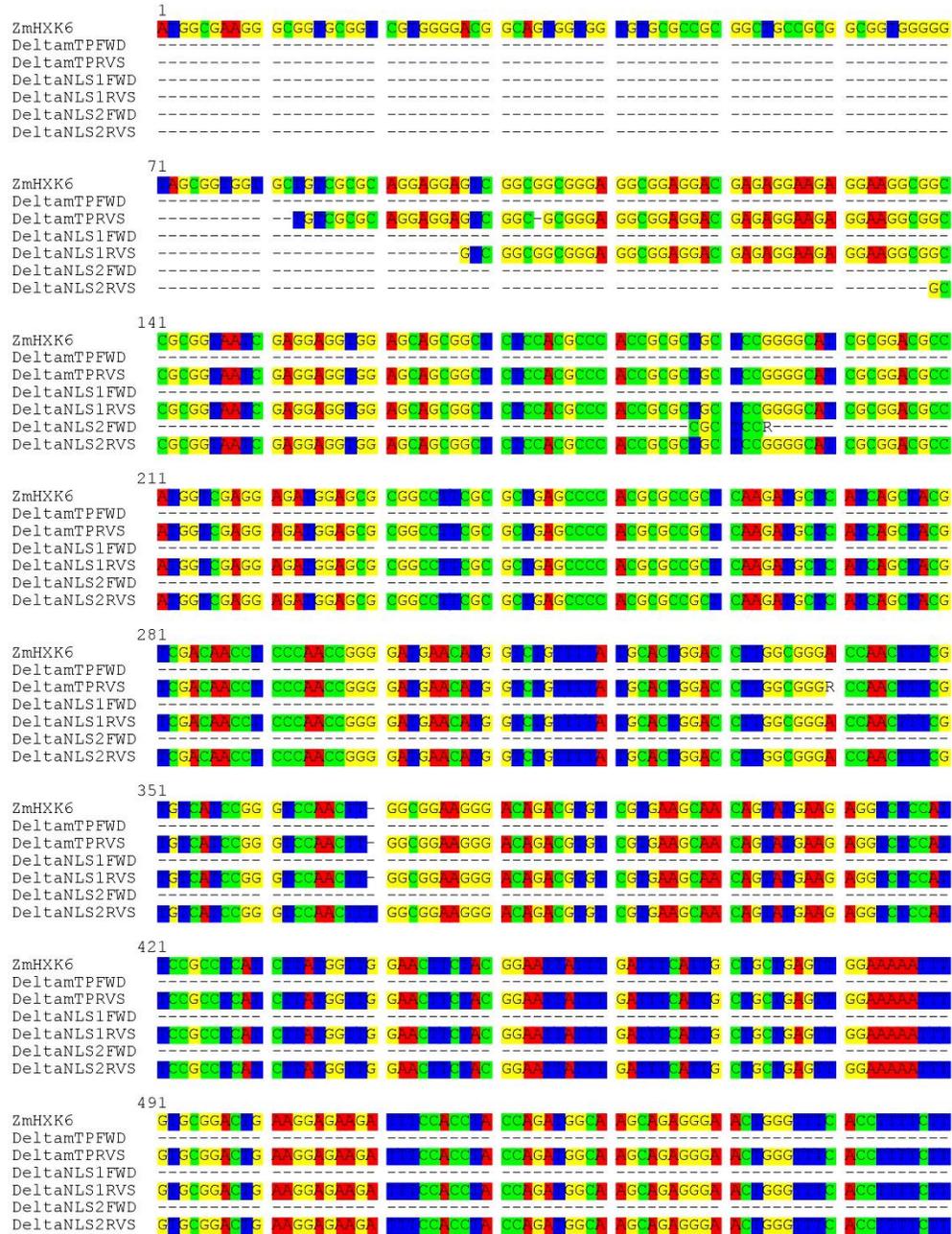
### *I. Tabla de los oligonucleótidos utilizados durante la clonación.*

Proteína producida	Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
ZmHXK6ΔmTP	ZmHXK6ΔmTPFw	<u>AA AAA GCA GGC TTC GAA GGA</u> <u>GAT AGA ACC ATG</u> TCGCGCAGGAGGAGTCGG
ZmHXK6ΔmTPΔNLS1	ZmHXK6ΔNLS1Fw	<u>AA AAA GCA GGC TTC GAA GGA</u> <u>GAT AGA ACC ATG</u> GTCGGCGGCGGGAG
ZmHXK6ΔmTPΔNLS2	ZmHXK6ΔNLS2Fw	<u>AA AAA GCA GGC TTC GAA GGA</u> <u>GAT AGA ACC ATG</u> GCCGCGGTAATCGAGGAGGTG
Se utilizó para todas las proteínas	ZmHXK6 Rv	A GAA AGC TGG GTG TGC AGC TTC AGC ATA CTG GGA GTG C
Se utilizó para todas las proteínas	attB1 Forward	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC
Se utilizó para todas las proteínas	attB2 Reverse	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT
Se utilizó para la búsqueda del gen ZmHXK6Δ30 en las plantas sobreexpresoras	ZmHXK6Δ30Fw	AGGAGGAGTCGGCGGCGG



### III. Resultados de la secuenciación de las clonas obtenidas para las versiones truncas de ZmHXK6.

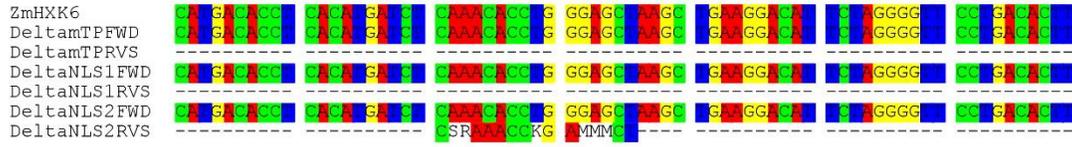
Alignment: C:\Users\Usuario\Desktop\ZmHXKdeltas  
 Seaview [blocks=10 fontsize=10 A4] on Wed May 08 13:17:48 2019



561

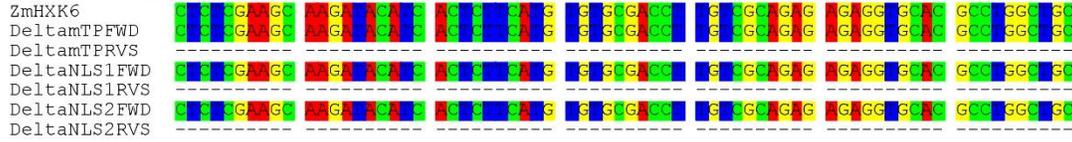
1121

ZmHXK6  
DeltamTPFWD  
DeltamTPRVS  
DeltaNLS1FWD  
DeltaNLS1RVS  
DeltaNLS2FWD  
DeltaNLS2RVS



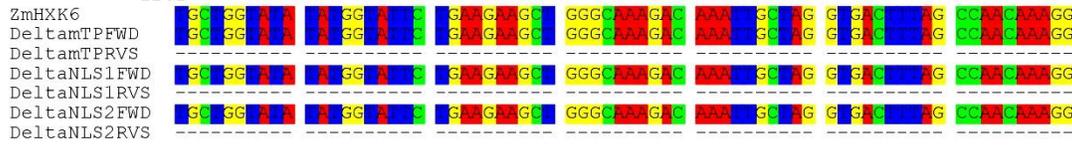
1191

ZmHXK6  
DeltamTPFWD  
DeltamTPRVS  
DeltaNLS1FWD  
DeltaNLS1RVS  
DeltaNLS2FWD  
DeltaNLS2RVS



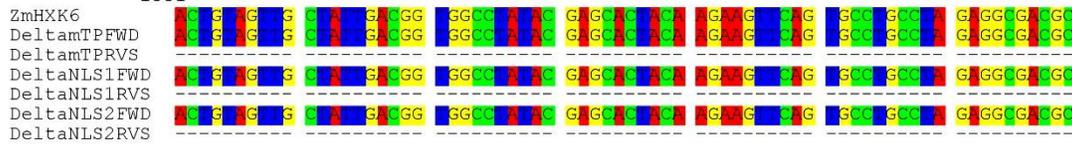
1261

ZmHXK6  
DeltamTPFWD  
DeltamTPRVS  
DeltaNLS1FWD  
DeltaNLS1RVS  
DeltaNLS2FWD  
DeltaNLS2RVS



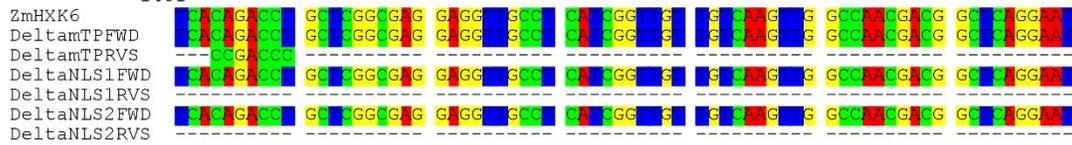
1331

ZmHXK6  
DeltamTPFWD  
DeltamTPRVS  
DeltaNLS1FWD  
DeltaNLS1RVS  
DeltaNLS2FWD  
DeltaNLS2RVS



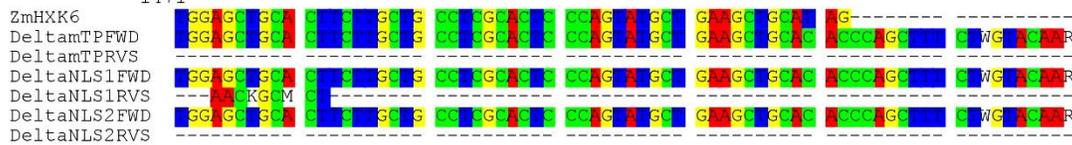
1401

ZmHXK6  
DeltamTPFWD  
DeltamTPRVS  
DeltaNLS1FWD  
DeltaNLS1RVS  
DeltaNLS2FWD  
DeltaNLS2RVS



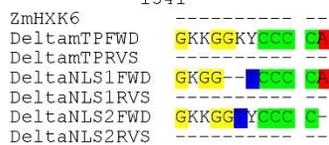
1471

ZmHXK6  
DeltamTPFWD  
DeltamTPRVS  
DeltaNLS1FWD  
DeltaNLS1RVS  
DeltaNLS2FWD  
DeltaNLS2RVS



1541

ZmHXK6  
DeltamTPFWD  
DeltamTPRVS  
DeltaNLS1FWD  
DeltaNLS1RVS  
DeltaNLS2FWD  
DeltaNLS2RVS



## IV. Resultados de la secuenciación de las clonas obtenidas para las versiones truncas de ZmHXXK6 en secuencia de proteínas.

Alignment: C:\Users\Usuario\Desktop\ZmHXXdeltas  
 Seaview [blocks=10 fontsize=10 A4] on Wed May 08 13:20:22 2019

ZmHXXK6	1	MAKGGAVVGT	AVVVCAAAAA	AVGVAVVLS	RRSRREAEED	ERKRKAAAVI	EEVEQRSLTP	TALLRGLADA
DeltamTPFWD		MAKGGAVVGT	AVVVCAAAAA	AVGVAVVLS	RRSRREAEED	ERKRKAAAVI	EEVEQRSLTP	TALLRGLADA
DeltamTPRVS		-----	-----	-----XSR	RRSRREAEED	ERKRKAAAVI	EEVEQRSLTP	TALLRGLADA
DeltaNLS1FWD		MAKGGAVVGT	AVVVCAAAAA	AVGVAVVLS	RRSRREAEED	ERKRKAAAVI	EEVEQRSLTP	TALLRGLADA
DeltaNLS1RVS		MAKGGAVVGT	AVVVCAAAAA	AVGVAVVLS	RRSRREAEED	ERKRKAAAVI	EEVEQRSLTP	TALLRGLADA
DeltaNLS2FWD		MAKGGAVVGT	AVVVCAAAAA	AVGVAVVLS	RRSRREAEED	ERKRKAAAVI	EEVEQRSLTP	TALLRGLADA
DeltaNLS2RVS		MAKGGAVVGT	AVVVCAAAAA	AVGVAVVLS	RRSRREAEED	ERKRKAAAVI	EEVEQRSLTP	TALLRGLADA
ZmHXXK6	71	MVEEMERGLR	AEPHAPLQML	ISYVDNLP TG	DEHGLFYALD	LGGTNFRVIR	VQLXKKGQTC	SEATV* RGLH
DeltamTPFWD		MVEEMERGLR	AEPHAPLQML	ISYVDNLP TG	DEHGLFYALD	LGGTNFRVIR	VQLXKKGQTC	SEATV* RGLH
DeltamTPRVS		MVEEMERGLR	AEPHAPLQML	ISYVDNLP TG	DEHGLFYALD	LGGTNFRVIR	VQLXKKGQTC	SEATV* RGLH
DeltaNLS1FWD		MVEEMERGLR	AEPHAPLQML	ISYVDNLP TG	DEHGLFYALD	LGGTNFRVIR	VQLXKKGQTC	SEATV* RGLH
DeltaNLS1RVS		MVEEMERGLR	AEPHAPLQML	ISYVDNLP TG	DEHGLFYALD	LGGTNFRVIR	VQLXKKGQTC	SEATV* RGLH
DeltaNLS2FWD		MVEEMERGLR	AEPHAPLQML	ISYVDNLP TG	DEHGLFYALD	LGGTNFRVIR	VQLXKKGQTC	SEATV* RGLH
DeltaNLS2RVS		MVEEMERGLR	AEPHAPLQML	ISYVDNLP TG	DEHGLFYALD	LGGTNFRVIR	VQLXKKGQTC	SEATV* RGLH
ZmHXXK6	141	SASSYGWNFY	GIL*FHCC*V	GKICAD*RRR	FPPIRWQAE G	HGFHLFFPSA	PNIYILGDSN	*VDQRLHQW
DeltamTPFWD		SASSYGWNFY	GIL*FHCC*V	GKICAD*RRR	FPPIRWQAE G	HGFHLFFPSA	PNIYILGDSN	*VDQRLHQW
DeltamTPRVS		SASSYGWNFY	GIL*FHCC*V	GKICAD*RRR	FPPIRWQAE G	HGFHLFFPSA	PNIYILGDSN	*VDQRLHQW
DeltaNLS1FWD		SASSYGWNFY	GIL*FHCC*V	GKICAD*RRR	FPPIRWQAE G	HGFHLFFPSA	PNIYILGDSN	*VDQRLHQW
DeltaNLS1RVS		SASSYGWNFY	GIL*FHCC*V	GKICAD*RRR	FPPIRWQAE G	HGFHLFFPSA	PNIYILGDSN	*VDQRLHQW
DeltaNLS2FWD		SASSYGWNFY	GIL*FHCC*V	GKICAD*RRR	FPPIRWQAE G	HGFHLFFPSA	PNIYILGDSN	*VDQRLHQW
DeltaNLS2RVS		SASSYGWNFY	GIL*FHCC*V	GKICAD*RRR	FPPIRWQAE G	HGFHLFFPSA	PNIYILGDSN	*VDQRLHQW
ZmHXXK6	211	HGWRRCGG* I	E*GHGKAGS*	YESCSSG**Y	CRHIGWWEIC	***CCCCCN I	GHWHKCSLGG	TCKCDS*MDR
DeltamTPFWD		HGWRRCGG* I	E*GHGKAGS*	YESCSSG**Y	CRHIGWWEIC	***CCCCCN I	GHWHKCSLGG	TCKCDS*MDR
DeltamTPRVS		HGWRRCGG* I	E*GHGKAGS*	YESCSSG**Y	CRHIGWWEIC	***CCCCCN I	GHWHKCSLGG	TCKCDS*MDR
DeltaNLS1FWD		HGWRRCGG* I	E*GHGKAGS*	YESCSSG**Y	CRHIGWWEIC	***CCCCCN I	GHWHKCSLGG	TCKCDS*MDR
DeltaNLS1RVS		HGWRRCGG* I	E*GHGKAGS*	YESCSSG**Y	CRHIGWWEIC	***CCCCCN I	GHWHKCSLGG	TCKCDS*MDR
DeltaNLS2FWD		HGWRRCGG* I	E*GHGKAGS*	YESCSSG**Y	CRHIGWWEIC	***CCCCCN I	GHWHKCSLGG	TCKCDS*MDR
DeltaNLS2RVS		HGWRRCGG* I	E*GHGKAGS*	YESCSSG**Y	CRHIGWWEIC	***CCCCCN I	GHWHKCSLGG	TCKCDS*MDR
ZmHXXK6	281	AAT*IREHGN	QHGVGKLOIR	*TSKVG**I	LRLRKFEPP*	ADI*KDDFWN	VSWRNCPEDP	AETGS*CFIV
DeltamTPFWD		AAT*IREHGN	QHGVGKLOIR	*TSKVG**I	LRLRKFEPP*	ADI*KDDFWN	VSWRNCPEDP	AETGS*CFIV
DeltamTPRVS		AAT*IREHGN	QHGVGKLOIR	*TSKVG**I	LRLRKFEPP*	ADI*KDDFWN	VSWRNCPEDP	AETGS*CFIV
DeltaNLS1FWD		AAT*IREHGN	QHGVGKLOIR	*TSKVG**I	LRLRKFEPP*	ADI*KDDFWN	VSWRNCPEDP	AETGS*CFIV
DeltaNLS1RVS		AAT*IREHGN	QHGVGKLOIR	*TSKVG**I	LRLRKFEPP*	ADI*KDDFWN	VSWRNCPEDP	AETGS*CFIV
DeltaNLS2FWD		AAT*IREHGN	QHGVGKLOIR	*TSKVG**I	LRLRKFEPP*	ADI*KDDFWN	VSWRNCPEDP	AETGS*CFIV
DeltaNLS2RVS		AAT*IREHGN	QHGVGKLOIR	*TSKVG**I	LRLRKFEPP*	ADI*KDDFWN	VSWRNCPEDP	AETGS*CFIV
ZmHXXK6	351	WGCCSSETGT	AIYTEDSRVY	SHAP*HLT*S	QTPGS*AEGH	SRGS*HFSRS	KIHSSCVFPP	CRREACTPGC
DeltamTPFWD		WGCCSSETGT	AIYTEDSRVY	SHAP*HLT*S	QTPGS*AEGH	SRGS*HFSRS	KIHSSCVFPP	CRREACTPGC
DeltamTPRVS		WGCCSSETGT	AIYTEDSRVY	SHAP*HLT*S	QTPGS*AEGH	SRGS*HFSRS	KIHSSCVFPP	CRREACTPGC
DeltaNLS1FWD		WGCCSSETGT	AIYTEDSRVY	SHAP*HLT*S	QTPGS*AEGH	SRGS*HFSRS	KIHSSCVFPP	CRREACTPGC
DeltaNLS1RVS		WGCCSSETGT	AIYTEDSRVY	SHAP*HLT*S	QTPGS*AEGH	SRGS*HFSRS	KIHSSCVFPP	CRREACTPGC
DeltaNLS2FWD		WGCCSSETGT	AIYTEDSRVY	SHAP*HLT*S	QTPGS*AEGH	SRGS*HFSRS	KIHSSCVFPP	CRREACTPGC
DeltaNLS2RVS		WGCCSSETGT	AIYTEDSRVY	SHAP*HLT*S	QTPGS*AEGH	SRGS*HFSRS	KIHSSCVFPP	CRREACTPGC
ZmHXXK6	421	CWYIWYSEEA	GQRQIAR* I*	PTKDCSCY* R	WPIRALQEVQ	CLP*RGDAHRP	ARRGGCLIGC	COVGQRRLRN
DeltamTPFWD		CWYIWYSEEA	GQRQIAR* I*	PTKDCSCY* R	WPIRALQEVQ	CLP*RGDAHRP	ARRGGCLIGC	COVGQRRLRN
DeltamTPRVS		CWYIWYSEEA	GQRQIAR* I*	PTKDCSCY* R	WPIRALQEVQ	CLP*RGDAHRP	ARRGGCLIGC	COVGQRRLRN
DeltaNLS1FWD		CWYIWYSEEA	GQRQIAR* I*	PTKDCSCY* R	WPIRALQEVQ	CLP*RGDAHRP	ARRGGCLIGC	COVGQRRLRN
DeltaNLS1RVS		CWYIWYSEEA	GQRQIAR* I*	PTKDCSCY* R	WPIRALQEVQ	CLP*RGDAHRP	ARRGGCLIGC	COVGQRRLRN
DeltaNLS2FWD		CWYIWYSEEA	GQRQIAR* I*	PTKDCSCY* R	WPIRALQEVQ	CLP*RGDAHRP	ARRGGCLIGC	COVGQRRLRN
DeltaNLS2RVS		CWYIWYSEEA	GQRQIAR* I*	PTKDCSCY* R	WPIRALQEVQ	CLP*RGDAHRP	ARRGGCLIGC	COVGQRRLRN
ZmHXXK6	491	WSCTS CCLAL	PVC* SCTPSF	-----	-----	-----	-----	-----
DeltamTPFWD		WSCTS CCLAL	PVC* SCTPSF	-----	-----	-----	-----	-----
DeltamTPRVS		WSCTS CCLAL	PVC* SCTPSF	-----	-----	-----	-----	-----
DeltaNLS1FWD		WSCTS CCLAL	PVC* SCTPSF	-----	-----	-----	-----	-----
DeltaNLS1RVS		WSCTS CCLAL	PVC* SCTPSF	-----	-----	-----	-----	-----
DeltaNLS2FWD		WSCTS CCLAL	PVC* SCTPSF	-----	-----	-----	-----	-----
DeltaNLS2RVS		WSCTS CCLAL	PVC* SCTPSF	-----	-----	-----	-----	-----

V. Mapa del vector pEarley Gate 103.

