

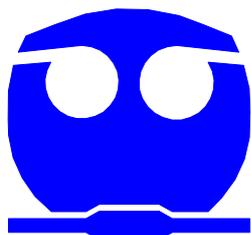


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SUBUNIDAD AKIN β
DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO SnRK1 DE *Arabidopsis*
thaliana.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA
P R E S E N T A :
NATALIA GUTIÉRREZ GRANADOS



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

PRESIDENTE: Profr. HOMERO HERNÁNDEZ MONTES
VOCAL: Profra. GLORIA GUTIÉRREZ VENEGAS
SECRETARIO: Profra. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO
1er SUPLENTE: Profra. VANESA MAYA AMPUDIA
2do SUPLENTE: Profra. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Asesor del tema: Dra: Martha Patricia Coello Coutiño

Sustentante: Natalia Gutiérrez Granados



Handwritten signatures of Martha Patricia Coello Coutiño and Natalia Gutiérrez Granados over horizontal lines.

Agradecimientos

Ésta tesis se realizó gracias a la asesoría, apoyo y trabajo de las siguientes personas e instituciones:

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Asesora del tema de tesis.

M.V.Z. Edmundo Atonatiu Gómez Martínez

Jefe del bioterio, Edificio A, Facultad de Química, UNAM.

Dra. Sonia Vázquez Santana

Lab. de desarrollo en plantas. Facultad de Ciencias, UNAM

M. en C. Lilia Bernal y Dr. Eleazar Martínez

Lab 101, Edificio E, Facultad de Química, UNAM

M. en C. Selene Fragoso, Dr. Martín Pedro Vargas y Dr. Elpidio García

Asesoría y apoyo técnico

Q. Laurel Fabila y M. en C. María Parra

Asesoría técnica

Proyectos:

DGAPA IN202206;

CONACyT 52072 y

PAIP 6290-13

Dedicatorias

Éste trabajo representa una parte de mi vida, que sé duro mucho pero aún con los tropiezos que he tenido, la conclusión de ésto ya es plausible. El trabajo aquí presentando me llena de orgullo porque es el reflejo de mi esfuerzo y constancia; sin embargo, el camino recorrido para alcanzar este sueño no lo realicé sola, siempre estuve acompañada por gente muy valiosa que ha dejado huellas importantes. Es ha ella a quien quiero dar mi mayor reconocimiento y gratitud...

Papá porque siempre creiste en mí, por tu ejemplo y porque me diste una infancia muy feliz.

Madre, por tu apoyo y por ser un buen ejemplo para mí.

Hugo porque en todo momento me has apoyado. When you cry...

Christian Peralta porque eres la única persona que aún en los momentos más difíciles sabe robarme sonrisas. Recuerda, Carbono - Hidrógeno, siempre unidos.

Mis amigos y compañeros: Juana Chávez, Thalia Huanosta, Jesús Contreras, León Guillermo Mendoza, Samantha Martínez, Jessica Hernández, Orquidea Lozada, María Camarena, Isidoro Alvarado, José Luis Rosas, Arturo Hidalgo, Diana Sánchez, Francisco Martínez. Porque ustedes son mi palabra mágica.

Gerardo Zaragoza y *Mayeli Estrada* por el apoyo y los momentos felices que a su lado pasé porque al final es lo único que me llevo.

A los chicos del E2 porque me enseñaron que hay cosas valiosas por las que es importante luchar...

A los chicos del E quienes han soportado mis dramas, mil gracias *Claudia Casillo*, *Julieta*, *Yazmin*, *Jess*, *Karla*, *Lore*, *César*, *Carlitos*, *Susana*, *Edson* y *Ulises*.

Por último quiero agradecer a la persona más importante en mi vida... yo.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Nutrición vegetal	1
1.2. Fósforo	1
1.3. Deficiencia de fosfato	2
1.3.1. Modificaciones morfológicas	3
1.3.2. Respuestas a nivel bioquímico y molecular	3
1.4. La familia de las proteínas cinasa tipo SNF1/AMPK/SnRK1	5
1.4.1. AMPK	5
1.4.2. SNF1	6
1.4.3. SnRK1	6
1.5. Subunidades presentes en los complejos SNF1/AMPK/SnRK1	8
1.5.1. Subunidad catalítica α	8
1.5.2. Subunidad γ	10
1.5.3. Subunidad β	10
1.5.4. Subunidades atípicas	11
1.5.5. Complejos SnF1/AMPK/SnRK1	12
1.6. Regulación de la actividad	13
2. Antecedentes	16
2.1. Objetivos	17
2.1.1. General	17
2.1.2. Particulares	17
3. Materiales y métodos	18
3.1. Germinación de semillas y crecimiento de plantas	18
3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	19

3.3. Preparación y electroforesis de geles de agarosa	20
3.4. Purificación de los fragmento de DNA de geles de agarosa	20
3.5. Ligación de la subunidad AKIN $\beta\gamma$ en el vector pGEM-T easy	20
3.6. Obtención del vector de expresión pGEX 4T-2	20
3.7. Ligación de $\beta\gamma$ en el vector de expresión pGEX 4T-2	21
3.8. Transformación bacteriana	21
3.9. Aislamiento de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina	21
3.10. Obtención y purificación de la proteína de fusión	21
3.11. SDS-PAGE	22
3.12. Generación de anticuerpos contra la proteína GST- $\beta\gamma$	22
3.13. Western blot	23
3.13.1. Revelado por fosfatasa alcalina	23
3.13.2. Revelado por peroxidasa	24
3.14. Determinación de la actividad de SnRK1	24
3.15. Identificación de plantas mutantes con inserción de T-DNA en el gen AKIN $\beta\gamma$	25
4. Resultados	26
4.1. Obtención y caracterización de la subunidad AKIN $\beta\gamma$	26
4.2. Obtención de la proteína GST- $\beta\gamma$	29
4.2.1. Transferencia de la subunidad $\beta\gamma$ al vector de expresión pGEX 4T-2	29
4.2.2. Expresión y purificación de la proteína GST- $\beta\gamma$	30
4.3. Obtención y caracterización de los anticuerpos anti-AKIN $\beta\gamma$	33
4.3.1. Inmunización de los conejos	33
4.3.2. Caracterización de los anticuerpos obtenidos	33
4.4. Localización de la subunidad AKIN $\beta\gamma$	34
4.4.1. Localización celular	34
4.4.2. Localización subcelular	35
4.5. Formación de posibles complejos funcionales con AKIN $\beta\gamma$	36
4.6. Interacción de la proteína AKIN $\beta\gamma$ con gránulos de almidón	38
4.7. Plantas mutantes $\beta\gamma$	40
4.7.1. Caracterización de las plantas	40
4.7.2. Caracterización de las plantas heterocigas para $\beta\gamma$	41
4.7.3. Determinación de la actividad de SnRK1	42
4.8. Efecto de la deficiencia de Pi.	42
4.8.1. Caracterización de las plantas sometidas a estrés	42

4.8.2. Determinación de la actividad de SnRK1	44
5. Análisis de resultados	45
6. Conclusiones	49
Bibliografía	50

Índice de figuras

1.1. Blancos de AMPK. Los procesos activados por AMPK se indican con flecha, mientras que los inhibidos, se indican con flechas truncas (modificada de Hardie, 2007)	6
1.2. Estructura de los dominios de las subunidades presentes en los complejos SNF1/ AMPK/ SnRK1 (modificada de Hardie, 2007)	9
1.3. Análisis filogenético de las subunidades γ de varios organismos (Tomado de Gissot <i>et al.</i> , 2006)	12
1.4. Complejos propuestos para SNF1, AMPK y SnRK1 (Modificada de Polge y Thomas, 2007)	13
1.5. Modelo de regulación de AMPK. (A) Activación de AMPK por LKB1, (B) Activación de AMPK por CaMKK β (Sanders <i>et al.</i> , 2007)	14
1.6. Modelo de regulación de SNF1 (Halford <i>et al.</i> , 2004)	15
4.1. Estructura intrón - exón del gen AKIN $\beta\gamma$	26
4.2. Amplificación de la subunidad AKIN $\beta\gamma$	27
4.3. Vector utilizado para la caracterización de la subunidad $\beta\gamma$	28
4.4. Productos de digestión del plásmido pGEM- $\beta\gamma$ con las enzimas BamHI y NotI	28
4.5. Vector utilizado para la expresión de la proteína $\beta\gamma$	29
4.6. Productos de digestión del plásmido pGEX - $\beta\gamma$	30
4.7. Amplificación de los fragmentos $\beta\gamma$ y GST - $\beta\gamma$	30
4.8. Diferentes extractos provenientes de la purificación de GST - $\beta\gamma$	31
4.9. Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-GST	32
4.10. A: Western blot con los sueros preinmunes de ambos conejos. B: Western blot con el anticuerpos anti- $\beta\gamma$ a diferentes concentraciones	34
4.11. Western blot con proteína extraída de hojas (Ec) y cloroplasto (C). A)Membrana teñida con rojo de Ponceau, B) Western blot utilizando anticuerpos anti- $\beta\gamma$	35
4.12. Inmunolocalizaciones en plantas tipo silvestres -Pi y +Pi	37
4.13. Interacción de la subunidad AKIN $\beta\gamma$ con las subunidades AKIN10 y AKIN11	38

4.14. Interacción de las subunidades catalíticas y AKIN $\beta\gamma$ con almidón. Se evaluaron proteínas asociadas al almidón en plantas WT y <i>a10</i> en luz (L) y oscuridad (O)	39
4.15. Modelo de amplificación del gen $\beta\gamma$ en plantas silvestres y heterócigas.	40
4.16. Amplificación del gen $\beta\gamma$ en plantas silvestres y heterócigas.	41
4.17. Diferencias en el crecimiento entre las plantas heterócigas y las del tipo silvestre.	41
4.18. Actividad de SnRK1 en las plantas de tipo silvestre y heterócigas	42
4.19. Hojas de las plantas silvestre y heteróciga en deficiencia y suficiencia nutrimental a 20 días de tratamiento	43
4.20. Vista general de las plantas en deficiencia y suficiencia de fosfato a 10 días de tratamiento	43
4.21. Diferencias en la actividad entre plantas heterócigas para $\beta\gamma$ y WT crecidas en deficiencia de Pi	44

Capítulo 1

Introducción

1.1. Nutrición vegetal

El agua es el principal constituyente de las plantas, representando alrededor del 90% de su peso fresco, el resto, la materia seca, está constituida principalmente de carbono, oxígeno e hidrógeno. Una pequeña pero indispensable porción de materia seca se conforma de elementos absorbidos del suelo como iones inorgánicos, denominados nutrientes esenciales (Singer y Munns, 1991). Los nutrientes esenciales son aquellos elementos necesarios para que las plantas completen su ciclo de vida. En general, cada uno tiene al menos una función en la que ningún otro puede sustituirlo. Estos elementos son clasificados, de acuerdo a su concentración relativa en el tejido vegetal, en macro y micronutrientes (Tabla 1.1) (Singer y Munns, 1991).

1.2. Fósforo

El fósforo es un macronutriente que forma parte de moléculas claves como ATP, ácidos nucleicos y fosfolípidos, además tiene un papel importante en el metabolismo energético, activación y desactivación de enzimas, metabolismo de aminoácidos, fotosíntesis, síntesis y degradación de membranas, glucólisis y respiración (Marschner, 1995; Vance *et al.*, 2003).

Elemento	Símbolo químico	Concentración en materia seca
Macronutrientes		%
Nitrógeno	N	1.5
Potasio	K	1.0
Calcio	Ca	0.5
Magnesio	Mg	0.2
Fósforo	P	0.2
Azufre	S	0.1
Silicio	Si	0.1
Micronutrientes		ppm
Cloro	Cl	100
Hierro	Fe	100
Boro	B	20
Manganeso	Mn	50
Sodio	Na	10
Zinc	Zn	20
Cobre	Cu	6
Níquel	Ni	0.1
Molibdeno	Mo	0.1

Tabla 1.1: Elementos requerido por la planta (Epstein, 1972)

1.3. Deficiencia de fosfato

A pesar de su importancia, el fósforo (P) es uno de los elementos menos disponibles, siendo el segundo macronutriente, después del nitrógeno, que limita el crecimiento de las plantas (Sachtman *et al.*, 1998). La principal causa de deficiencia de P se debe a que las plantas solo pueden absorberlo como iones ortofosfato (Pi), H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} (Schachtman *et al.*, 1998; Raghothama, 1999); estos aniones son muy reactivos y en el suelo forman compuestos como sales de Pi precipitadas; ésteres de Pi, fosfonatos y compuestos orgánicos como fitato. La presencia de cada una de las formas no asimilables de P depende del pH del suelo, en suelos ácidos, el P forma complejos poco solubles con aluminio y hierro, mientras que en suelos alcalinos se combina con calcio y magnesio (López-Bucio *et al.*, 2003; Hirsch *et al.*, 2006). De esta forma, aún cuando el P abunda en la mayoría de los suelo, con frecuencia la forma asimilable no es suficiente para satisfacer las necesidades de las plantas (Grossman y Takahashi, 2001). Es por esto que las plantas han desarrollado diferentes estrategias, que por una parte les permita aumentar la adquisición de éste elemento y por la otra, optimizar su utilización (Raghotama, 1999).

1.3.1. Modificaciones morfológicas

Cuando la planta es sometida a condiciones de deficiencia de fósforo, la primera modificación se da en la arquitectura de la raíz (Raghotama, 1999). En la mayoría de las plantas el crecimiento de la raíz aumenta al igual que la cantidad de raíces secundarias y la densidad de los pelos radiculares, de ésta forma la superficie de exploración y adquisición de nutrientes aumenta (Raghothama, 1999; Williamson *et al.*, 2001). En *A. thaliana* los cambios son un poco diferentes, en ellas se inhibe el crecimiento de la raíz principal y proliferan las raíces laterales y los pelos radiculares. Mientras que el crecimiento radical aumenta, el desarrollo de la parte aérea se ve inhibido (López-Bucio *et al.*, 2003). Existe una disminución en la cantidad de hojas así como la reducción en el área superficial de éstas. En contraste, el contenido proteico y de clorofila por unidad de área no se ve afectado. A medida que la formación de cloroplastos se retarda, el contenido de clorofila se incrementa y las hojas adquieren una coloración verde oscura. A pesar de esto, la eficiencia fotosintética por unidad de clorofila es menor (Singer y Munns, 1991). Si la deficiencia persiste, las hojas acumulan antocianinas y adquieren una coloración púrpura. En condiciones severas, la planta puede detener su desarrollo y morir en etapas tempranas (Marschner, 1995).

1.3.2. Respuestas a nivel bioquímico y molecular

La exudación de ácidos orgánicos, fosfatasas ácidas y RNAsas para solubilizar o liberar Pi de fuentes orgánicas, son algunas de las estrategias que más utiliza la planta para adaptarse a la deficiencia de Pi (Raghothama, 2000).

Durante la deficiencia de Pi, los niveles de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos orgánicos se incrementan; tal es el caso de la PEP carboxilasa (López-Bucio *et al.*, 2000). La liberación de ácidos orgánicos permite el secuestro de Al^{3+} , Fe^{3+} y Ca^{2+} y subsecuentemente el desplazamiento de Pi de su forma precipitada (Hinsiger, 2001; Ryan *et al.*, 2001).

Las fosfatasas se han identificado como ácidas o alcalinas dependiendo del pH óptimo para catálisis (Duff *et al.*, 1994). Las fosfatasas alcalinas presentan una especificidad de sustrato

muy estricta y juegan papeles importantes en el metabolismo, por ejemplo la fructuosa 1-6 bifosfatasa, que es una enzima clave en la gluconeogénesis. Por otro lado, las fosfatasa s ácidas son inespecíficas. Se cree que las fosfatasa s extracelulares tienen un papel importante en la liberación de Pi desde fuentes orgánicas, mientras que las fosfatasa s intracelulares pueden estar regulando el suplemento de Pi desde fuentes orgánicas internas (Duff *et al.*, 1989; Grossman y Takahashi, 2001).

Otra estrategia seguida por las plantas que crecen en deficiencia de P, es la expresión de transportadores de alta afinidad, éstos permiten que la velocidad de toma de Pi en las raíces sea alta cuando las concentraciones de fosfato no son grandes (Furihata *et al.*, 1992; Mimura, 1995; Mukatira *et al.*, 2001).

Dentro de las plantas se dan cambios en el metabolismo que permiten optimizar el uso del Pi adquirido. Mientras los niveles de ATP y ADP disminuyen, la concentración de pirofosfato (PPi) parece mantenerse constante (Duff *et al.*, 1989). De esta forma las enzimas dependientes de ATP pueden ser sustituidas por otras que usan pirofosfato, tal es el caso de la fosfofructocinasa dependiente de PPi que, bajo deficiencia de fosfato, puede sustituir a la fosfofructocinasa (PFK) y generar fructuosa 1,6-bifosfato (Theodorou *et al.*, 1992). Otra vía alterna conocida en plantas es catalizada por la acción de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (NAD-G3PDH) que no fosforila y evita el uso de NAD-G3PDH dependiente de Pi y la fosfoglicerato cinasa (Duff *et al.*, 1989).

La deficiencia de fosfato induce de forma directa o indirecta la expresión de genes, por esto, puede considerarse como una señal que estimula la expresión genética. En *Arabidopsis thaliana* se ha visto que aproximadamente 1835 genes exhiben alteraciones en su expresión en respuesta a la deficiencia de Pi, siendo mayor el número de genes alterados en hojas que en raíces (Wu *et al.*, 2003).

Los genes identificados que aumentan su expresión en respuesta a la deficiencia de Pi pueden clasificarse en genes que codifican proteínas involucradas en fotosíntesis, metabolismo del carbono, síntesis de proteínas, factores de transcripción y transducción de señales (Ramírez *et al.*,

2005).

Trabajo realizado en nuestro laboratorio indicó que en plantas de frijol sometidas a deficiencia de fosfato, existe la inducción de genes que están directamente involucrados en vías de transducción de señales. Uno de ellos es un regulador de respuesta que forma parte del sistema de dos componentes que podrían estar involucrados en la respuesta a deficiencia de fosfato a través de citocininas (Camacho *et al.*, 2008). Otro gen que se induce en éstas condiciones de estrés, codifica para una proteína que forma parte de un complejo heterotrimérico con actividad de cinasa denominado SnRK1 (Coello, datos no publicados).

1.4. La familia de las proteínas cinasa tipo SNF1/AMPK/SnRK1

SnRK-1 (SNF1-Related Protein Kinase-1) es una proteína cinasa presente en plantas superiores con un dominio catalítico similar al de SNF1 (Sucrose Non-fermenting-1) de levaduras y AMPK (AMP-activated protein Kinase) de animales (Hardie, 2000). SnRK1 pertenece a la superfamilia de proteínas cinasa, CDPK-SnRKs a la que también pertenecen las cinasas dependientes de calmodulina (CaMKs) y las proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPKs) (Harabak *et al.*, 2003).

1.4.1. AMPK

La proteína cinasa activada por AMP, AMPK, es un componente río abajo de una cascada de señalizaciones altamente conservada que juega un papel esencial en la regulación metabólica (Hardie y Carling 1998). AMPK es activada por cambios en la relación AMP:ATP causada por diferentes tipos de estrés como: hipoxia, isquemia, ejercicio o contracción muscular, adicionalmente, es activada por hormonas como la leptina (Minokoshi *et al.*, 2004), adinoptina (Yamauchi *et al.*, 2002) y por metformina, una de las drogas más utilizadas para el tratamiento de la diabetes tipo II (Zou *et al.*, 2004). A nivel celular, AMPK ha sido implicada en procesos que incluyen la regulación transcripcional, la regulación de la síntesis proteica y la regulación postraduccional de múltiples enzimas (Rutte *et al.*, 2003).

La activación de ésta enzima promueve la conservación de ATP al fosforilar e inactivar enzimas presentes en vías anabólicas, mientras que activa vías catabólicas (Figura 1.1) (Hardie, 2007).

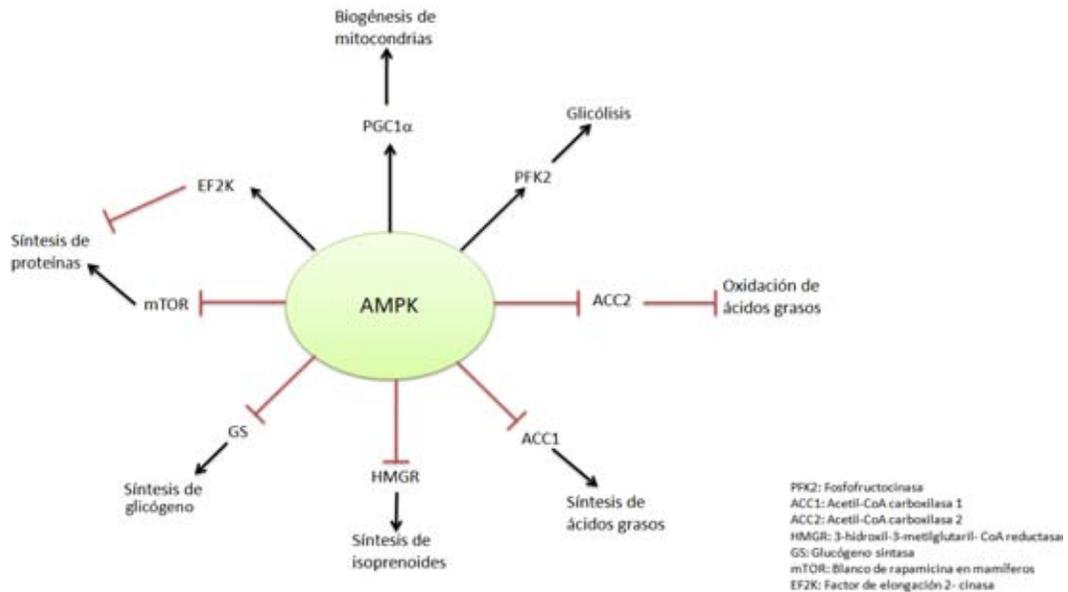


Figura 1.1: Blancos de AMPK. Los procesos activados por AMPK se indican con flecha, mientras que los inhibidos, se indican con flechas truncadas (modificada de Hardie, 2007)

1.4.2. SNF1

En levaduras, SNF1 es clave en el cambio diáuxico de un metabolismo fermentativo a uno oxidativo en respuesta a una deficiencia en glucosa (Wilson *et al.*, 1996) y ha sido implicada en la respuesta ante diferentes tipos de estrés como choque térmico, sal y deficiencia de nutrientes (Carlson *et al.*, 1999). SNF1 regula la actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos y glucógeno, además es necesario para la esporulación, acumulación de glucógeno y biogénesis de peroxisomas (Halford y Hardie, 1998; Halford *et al.*, 2004).

1.4.3. SnRK1

SnRK1 ha sido menos estudiada en comparación con sus homólogas de levaduras y mamíferos; sin embargo, la remarcable similitud en la estructura entre éstos complejos sugieren la existencia

de una función ancestral en común en la regulación de la energía y el metabolismo de carbono (Polge y Thomas, 2007). Al igual que sus homólogos, se cree que SnRK1 esta directamente involucrada en la regulación del metabolismo de carbohidratos y tiene también acción a nivel de expresión genética.

La familia SnRK ha sido agrupada, debido a su similitud en secuencia y estructura de dominios, en tres subfamilias: SnRK1, SnRK2 y SnRK3 (Hardie y Carling, 1998). A diferencia de SnRK1, las dos subfamilias restantes muestran mayor divergencia a nivel de secuencia con SNF1 y son incapaces de complementar al mutante Δ Snf1 de levadura (Harabak *et al.*, 2003).

En el caso de cereales, SnRk1 se subdivide en dos grupos, SnRK1a y SnRK1b, siendo el subgrupo de SnRK1a el más similar a la hómologa en dicotiledóneas y se expresa en toda la planta, mientras que SnRK1b es única de cereales y se expresa principalmente en la semilla (Halford *et al.*, 2003b).

In vitro, SnRK1 fosforila e inactiva cuatro enzimas metabólicas importantes: la 3-hiroximetil-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) (Dale *et al.*, 1995a; Dale *et al.*, 1995b; Sudgen *et al.*, 1999); sacarosa fosfato sintasa (SPS) que cataliza la biosíntesis de sacarosa; nitrato reductasa (NR), enzima que cataliza el primer paso de asimilación de nitrógeno para la generación de aminoácidos (Sudgen *et al.*, 1999) y la trealosa fosfato sintasa 5 (TPS5), enzima clave en la síntesis de trealosa-6-fosfato (Harthill *et al.*, 2006).

SnRK1 indirectamente controla el metabolismo de carbohidratos, ya que modula la transcripción de genes como la sacarosa sintasa, implicada en la degradación de sacarosa (Purcell *et al.*, 1998). Con respecto al almidón, SnRK1, es necesaria para la expresión de la α -amilasa y modula la actividad de la ADP-glucosa pirofosforilasa, enzimas involucradas en la degradación y biosíntesis de almidón respectivamente (Laurie *et al.*, 2003; Tiessen *et al.*, 2003). Defectos en la acumulación de almidón han sido demostrados en *Psycomitrella patens*, donde dobles mutantes de *snf1* mostraron defectos en su acumulación (Thelander *et al.*, 2004). En cebada, cuando la subunidad catalítica de SnRK1 se expresó en antisentido, se obtuvieron granos pequeños con poco o ningún contenido de almidón (Zhang *et al.*, 2001). Por otra parte, la sobreexpresión de

ésta proteína en papa, provocó un aumento en la cantidad de almidón (McKibbins *et al.*, 2006).

Con respecto al desarrollo, se sabe que SnRK1 juega un papel importante en él. Estudios con una doble mutante de *snf1* en *P. patens* permitió la caracterización de un fenotipo que incluye un desarrollo anormal, senescencia prematura y alteraciones en la sensibilidad a hormonas, además, es incapaz de crecer en un ciclo normal de luz-oscuridad (Thelander *et al.*, 2004). En plantas de *Pisum sativum*, que presentan expresión de SnRK1 en antisentido, se ha descrito semillas con defectos en la maduración, alteración en los cotiledones, defectos en la forma y simetría, así como una germinación precoz (Radchuk *et al.*, 2006). Por el contrario, cuando las subunidades catalíticas son sobreexpresadas en *A. thaliana*, se observa retraso en la florescencia y senescencia (Baena *et al.*, 2007).

Éste complejo también ha sido implicado en la respuesta a la defensa contra patógenos. Cuando es sobreexpresada, provoca una mayor resistencia ante el ataque de germinivirus, mientras que la expresión de la secuencia en antisentido provoca mayor sensibilidad ante el ataque (Hao *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2006). También se ha demostrado que una subunidad específica de plantas, AKIN $\beta\gamma$, interacciona con dos proteínas involucradas en la resistencia a nemátodos (Gissot *et al.*, 2006).

1.5. Subunidades presentes en los complejos SNF1/AMPK/SnRK1

Los miembros de la familia cinasa SNF1/AMPK/SnRK1 forman un complejo heterotrimérico conformado por una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras denominadas β y γ (Halford *et al.*, 2003a) (Figura 1.2).

1.5.1. Subunidad catalítica α

El gen *snf1* (sucrose non-fermentig-1) se describió e identificó en mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que no crecían en fuentes de carbono alternas a glucosa, tales como sacarosa o galactosa. Los genes requeridos para el crecimiento en estas fuentes de carbono son reprimidos por glucosa y su derepresión requiere al gen *snf1* (Gancedo, 1998).

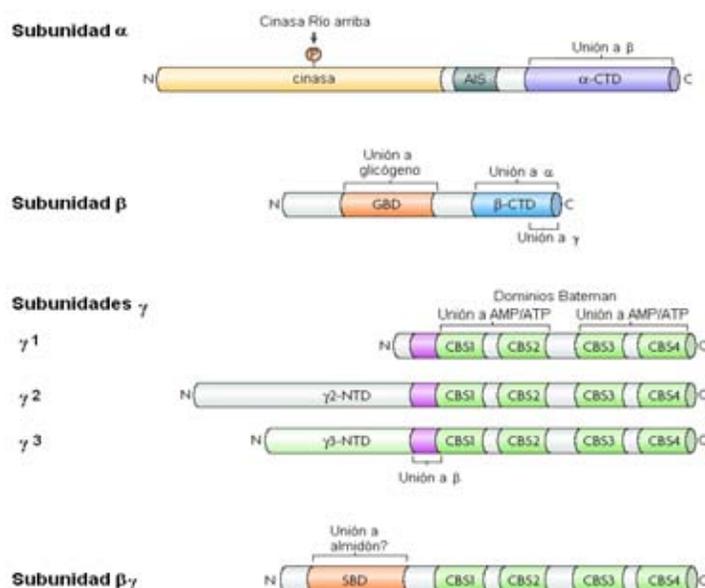


Figura 1.2: Estructura de los dominios de las subunidades presentes en los complejos SNF1/ AMPK/ SnRK1 (modificada de Hardie, 2007)

La subunidad catalítica en levaduras, codificada por el gen *snf1*, tiene un peso de 72 kDa con un dominio cinasa de 330 amino ácidos cerca de la región amino terminal. En mamíferos, existen dos isoformas para la subunidad α ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) y son codificadas por los genes PRKAA1 y PRKAA2 (Hardie, 2007). Estas subunidades se distinguen en su afinidad por sustratos y su localización subcelular (Woods *et al.*, 1996; Salt *et al.*, 1998). La expresión de la subunidad $\alpha 1$ parece estar propagada en todo el cuerpo y al parecer se encuentra localizada en el citoplasma, la subunidad $\alpha 2$ se restringe al corazón, músculo e hígado y se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo (Nielsen *et al.*, 2003). En plantas existen tres genes que codifican para la subunidad catalítica: AKIN10, AKIN11 y AKIN12 aunque se cree que éste último puede presentar niveles de expresión muy bajos durante todo el desarrollo (Bouly *et al.*, 1999; Bhalerao *et al.*, 1999).

Las subunidades catalíticas descritas en los tres reinos presentan una identidad cercana al 48% al comparar las secuencias completas, y una similitud de 60-65% si se restringe al dominio cinasa (Polge y Thomas, 2007). Éstas subunidades se caracterizan por un dominio catalítico tipo cinasa serina/treonina y un dominio autoinhibitorio (AID) presentes en los extremos amino terminal y carboxilo terminal respectivamente (Halford *et al.*, 2003b). SNF1 y SnRK1, al igual

que proteínas relacionadas a AMPK, poseen un dominio UBA (ubiquitin-associated) localizado después del dominio catalítico; sin embargo, AMPK α 1 y 2 no poseen un dominio UBA obvio (Jaleel *et al.*, 2006).

1.5.2. Subunidad γ

La subunidad γ es una subunidad regulatoria que se encuentra implicada en el mantenimiento de la conformación activa de la subunidad catalítica, debido que se une al dominio autoinhibitorio de α (Ferrando *et al.*, 2001). En levaduras, ésta subunidad es codificada por el gen SNF4 y se ha demostrado que su interacción con SNF1 está regulada por glucosa (Halford *et al.*, 2004). En mamíferos han sido descritas tres isoformas de la subunidad γ (γ 1, γ 2 y γ 3) que son codificadas por los genes PRKAG1, PRKAG2 y PRKAG3, respectivamente (Hardie, 2007). En plantas, las subunidades γ se dividen en tres clases: AKIN γ , AKIN $\beta\gamma$ y las proteínas PV42/BsnIP1-type proteins (Slocombe *et al.*, 2002; Gissot *et al.*, 2006). Los niveles de conservación entre las subunidades presentes en los tres reinos varia del 20 al 35 % y corresponde principalmente a cuatro motivos CBS (cystathionine β -syntase) (Polge y Thomas, 2007). Éstos motivos funcionan como dímeros formando dos dominios denominados Bateman, siendo en éstos dominios donde se fijan las moléculas AMP o ATP en mamíferos (Scott *et al.*, 2004; Kemp *et al.*, 2004). En plantas aún no se ha demostrado que sean funcionales.

1.5.3. Subunidad β

Las subunidades β son requeridas para el ensamblaje del complejo y su localización subcelular (Vincent *et al.*, 2005). En levadura, se han caracterizado tres subunidades β , SIP1, SIP2 (Snf1-interacting protein 1 y 2) y Gal83 (galactose metabolism-83). Las tres proteínas son intercambiables en el complejo cinasa SNF1 dirigiendo al complejo a diferentes blancos (Yang *et al.*, 1994). En mamíferos existen dos isoformas para la subunidad β , β 1 y β 2 que son codificadas por los genes PRKAB1 y PRKAB2 (Hardie, 2007). Dentro de las plantas, las subunidades β pueden ser agrupadas en dos clases, unas que se encuentra estrechamente relacionada a las

subunidades β descritas en mamíferos y levaduras (AKIN β 1 y AKIN β 2), y otra que presenta una estructura atípica, AKIN β 3 (Gissot *et al.*, 2004).

Las subunidades β se caracterizan por tener tres dominios. Hacia el extremo amino terminal se encuentra el dominio KIS (kinase interacting sequence) que interactúa con la subunidad catalítica (SNF1) (Halford *et al.*, 2003b), hacia el extremo carboxilo terminal, está el dominio ASC (association with SNF1 complex) que interactúa con la subunidad reguladora SNF4 independientemente de la subunidad SNF1 (Jiang *et al.*, 1997). Existe un tercer dominio que sobrelapa al dominio KIS, éste dominio presenta las características de un dominio N-isoamilasa (Hudson *et al.*, 2003) y se ha denominado GBD (glycogen-binding domain) debido a que une glucógeno. Se especula que en plantas éste dominio podría estar uniéndose a almidón (Machovic *et al.*, 2006).

1.5.4. Subunidades atípicas

En el año 2001 se identificó en maíz, un tipo de subunidad con una organización de dominios diferente que se denominó ZmAKIN $\beta\gamma$ -1 y -2 (Lumbreras *et al.*, 2001). Éstas subunidades se encuentran relacionada con las subunidades γ y complementan a la mutante *snf4*. Hacia su región amino terminal presentan una secuencia relacionada al dominio KIS característico de las subunidades β , hacia su región carboxilo terminal los cuatro motivos CBS característicos de las subunidades γ . Éste tipo de subunidad ha sido descrita en otras especies como *M. truncatula* y *A. thaliana* (Buitink *et al.*, 2003). En Arabidopsis, AKIN $\beta\gamma$ es el ortólogo de ZmAKIN $\beta\gamma$ -1 y -2 y corresponde a la anotación inicial *AtSNF4* (Kleinow *et al.*, 2000). Se ha demostrado, por análisis filogenético, que éste tipo de subunidad se restringe al reino de plantas (Gissot *et al.*, 2006) (Figura 1.3).

AKIN β 3, es una proteína de 114 aa con una masa molecular de 12.7 kDa que parece ser una forma trunca de las subunidades β ya que carece por completo del dominio GBD. En la parte conservada de la secuencia, la identidad de AKIN β 3 es de 50 % y 41 % con respecto a AKIN β 1 y AKIN β 2 respectivamente. Se ha demostrado que ésta subunidad es capaz de complementar

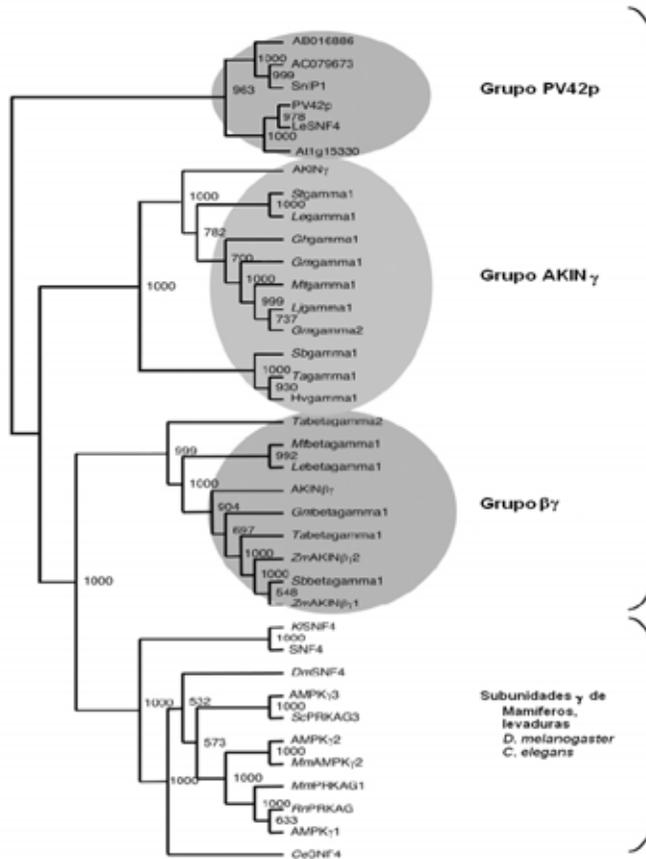


Figura 1.3: Análisis filogenético de las subunidades γ de varios organismos (Tomado de Gissot *et al.*, 2006)

al triple mutante de β sugiriendo que algunas de sus funciones básicas se conservan, además, es capaz de interactuar con la subunidades $AKIN\beta\gamma$ y las dos subunidades catalíticas pero es incapaz de interactuar con la subunidad γ (Gissot *et al.*, 2004).

1.5.5. Complejos SnF1/AMPK/SnRK1

En *Saccharomyces cerevisiae* se sabe que la subunidad SnF4 interactúa con la subunidad catalítica únicamente en la ausencia de glucosa. A pesar de esto, el complejo es estable en presencia de éste carbohidrato debido a que la subunidad β sirve de anclaje para ambas subunidades (Polge y Thomas, 2007) (Figura 1.4).

El complejo AMPK es estable únicamente cuando las tres subunidades están presentes y AMP es necesario para la interacción entre la subunidad catalítica y γ (Willson *et al.*, 1996).

Al igual que en levaduras, la subunidad β interactúa con las otras dos subunidades (Polge y Thomas, 2007) (Figura 1.4)

Gissot *et al* (2004) demostraron que existe una interacción entre el dominio ASC de la subunidad catalítica y las subunidades γ y $\beta\gamma$ y dependiendo de la subunidad β presente en el complejo la importancia de los dominios ASC y KIS en la fijación de la cinasa varía. Debido a la existencia de las subunidades $\beta 3$ y $\beta\gamma$, únicas en plantas, se han sugerido tres tipos diferentes de complejos (Gissot *et al.*, 2006; Polge y Thomas, 2007) (Figura 1.4)

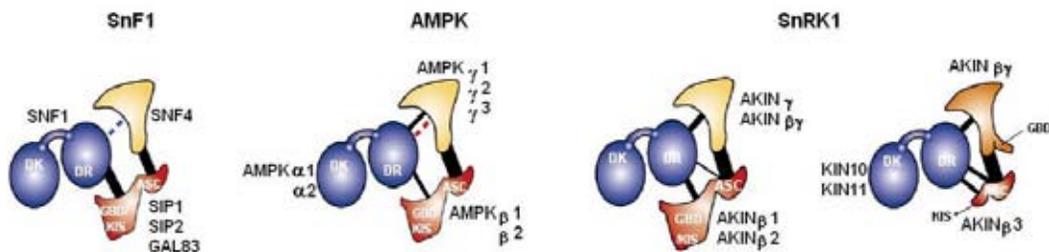


Figura 1.4: Complejos propuestos para SNF1, AMPK y SnRK1 (Modificada de Polge y Thomas, 2007)

1.6. Regulación de la actividad

SNF1, AMPK y SnRK1 presentan diferentes mecanismos de activación, de ellos AMPK es probablemente el mejor estudiado.

AMPK es activada cuando la concentración de AMP aumenta. Para activar al complejo, es necesaria la unión de AMP a la subunidad γ a través de los dominios Bateman (Sanders *et al.*, 2007). La activación total del complejo se da por la fosforilación, a través de proteínas cinasas río arriba (AMPKK), de la Thr¹⁷² (Hawley *et al.*, 1996). Una vez formado el complejo AMPK-P, su desfosforilación es inhibida por la acción de AMP sobre proteínas fosfatasa (Sanders *et al.*, 2007). Bajo niveles fisiológicos las AMPKK identificadas son: LKB1 y CaMKK β (Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase kinase β) (Woods *et al.*, 2003; Hurley *et al.*, 2005). LKB1 parece estar constitutivamente activa y su actividad no cambia por estímulos que activan a AMPK (Woods

et al., 2003). El incremento de Thr¹⁷² fosforilada por LKB1 puede ocurrir en respuesta al descenso en la desfosforilación de AMPK-P después de un aumento en la concentración de AMP (Figura 1.5 A). A diferencia de LKB1, la activación de CaMKK β está sujeta a regulación dentro de la célula y se incrementa en respuesta a señales que aumentan los niveles de Ca²⁺, de esta manera, las señales que incrementan la concentración de Ca²⁺ activan a AMPK (Figura 1.5B) (Sanders *et al.*, 2007) .

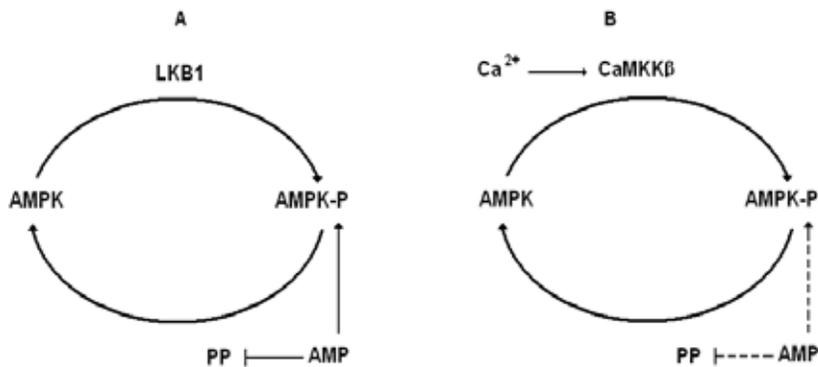


Figura 1.5: Modelo de regulación de AMPK. (A) Activación de AMPK por LKB1, (B) Activación de AMPK por CaMKK β (Sanders *et al.*, 2007)

El modelo propuesto en levaduras indica que en altos niveles de glucosa la subunidad catalítica SNF1 y la subunidad reguladora SNF4 están disociadas. El dominio regulatorio de SNF1 enmascara al dominio catalítico dejando a la enzima inactiva. En bajo niveles de glucosa el dominio regulatorio de la subunidad catalítica se une a SNF4 facilitando su activación de la cinasa (Halford *et al.*, 2003b) (Figura 1.6). La activación completa del complejo se da por proteínas cinasas río arriba que fosforilan a un residuo de treonina, Thr²¹⁰. En éstos organismos tres proteínas cinasas río arriba han sido identificadas y corresponden a Sak1, Elm1 y Tos3 (Hardie y Carling, 1998). En contraste con AMPK, en SNF1 no se ha demostrado que exista una activación por AMP (Woods *et al.*, 1996).

Al igual que AMPK y SNF1, SnRK1 es activada por la fosforilación de un residuo treonina, presente en el llamado "Loop T" o segmento de activación, por proteínas cinasas río arriba.

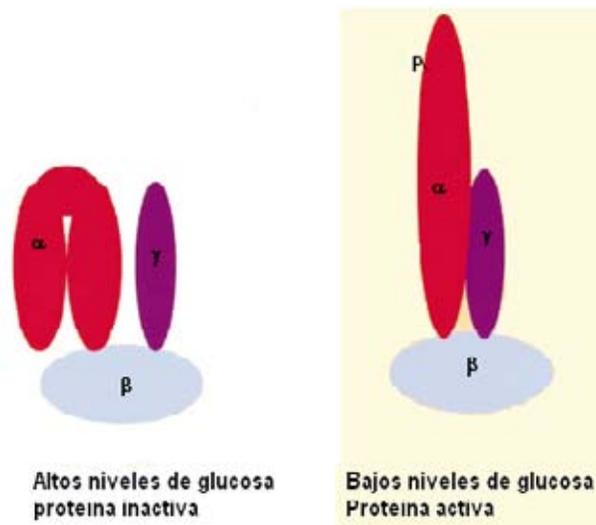


Figura 1.6: Modelo de regulación de SNF1 (Halford *et al.*, 2004)

En *A. thaliana* se han identificado dos de éstas proteínas cinasas, AtSnAK1 y AtSnAK2 (Hey *et al.*, 2007). Al igual que en levaduras, no existe evidencia de que AMP active directamente el complejo; sin embargo, se sabe que éste nucleótido afecta su estado de fosforilación (Sudgen *et al.*, 1999).

Capítulo 2

Antecedentes

Plantas crecidas bajo condiciones de deficiencia de fosfato desencadenan una gran cantidad de respuestas para poder contrarrestar ésta deficiencia nutrimental. De acuerdo con datos obtenidos en nuestro laboratorio, las proteínas cinasas tipo SnRK1 podrían estar implicadas en dicha respuesta. La amplia información obtenida en células animales, en donde sus homólogos, las AMPK´s tienen como función mantener la homeostasis energética a través de la regulación de enzimas que controlan algunas vías metabólicas, sugiere que SnRK1 podría desempeñar un papel equivalente durante la deficiencia de fosfato en plantas ya que ésta situación desencadena un desequilibrio energético. El análisis de las diferentes subunidades catalíticas con fusión a GFP, indicó que tanto AKIN10 como AKIN11 tienen localización cloroplástica y, minoritariamente se encuentran localizadas en el citoplasma. Durante la deficiencia de fosfato, la actividad de la subunidad AKIN10 aumenta a través de la fosforilación de la treonina 172 localizada en el "Loop T" mientras que AKIN11 es degradada específicamente; sin embargo, la actividad de SnRK1 disminuye en éstas condiciones. Estos resultados indican que en deficiencia de fosfato, la subunidad AKIN10 forma parte de los complejos activos que podrían estar regulando el metabolismo y la expresión genética. A pesar de que existen muchos datos acerca de las subunidades catalíticas que podrían estar presentes, poco se sabe acerca de las subunidades reguladoras y es por ello que en éste trabajo de tesis se estudió a una subunidad reguladora específica de plantas, AKIN $\beta\gamma$. Con éstos datos la hipótesis de éste trabajo es:

La subunidad reguladora AKIN $\beta\gamma$ forma complejos con las subunidades catalíticas y éstos se localizan en el cloroplasto.

2.1. Objetivos

2.1.1. General

Generar anticuerpos específicos contra la subunidad AKIN $\beta\gamma$ y caracterizar a ésta subunidad reguladora.

2.1.2. Particulares

- ★ Sobreexpresar a la subunidad AKIN $\beta\gamma$ en *E. coli*.
- ★ Generar anticuerpos específicos contra AKIN $\beta\gamma$.
- ★ Determinar la localización de la proteína.
- ★ Determinar la interacción de la proteína con las subunidades catalíticas.
- ★ Evaluar el papel que AKIN $\beta\gamma$ desempeña dentro de las plantas a través de mutantes con inserción de T-DNA.

Capítulo 3

Materiales y métodos

3.1. Germinación de semillas y crecimiento de plantas

Semillas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre variedad columbia y semillas con inserción de T-DNA Salk_074210, obtenidas del Arabidopsis Research Center (ARC) fueron lavadas con una disolución de hipoclorito de sodio al 15% (v/v) y Tween 20 al 0.03% (v/v) por 5 minutos. Se enjuagaron con agua estéril en 12 tiempos de 2 minutos cada uno. Las semillas se sembraron en cajas con medio B5, 1% de agar y 2% de sacarosa y se dejaron 24 horas a 4 °C, después se trasladaron a una cámara de crecimiento a 22°C con fotoperiodos de 8h luz por 16 h oscuridad. Después de dos semanas, tanto las plantas silvestres como las mutantes se trasladaron a cajas que contenían 1% agar, 2% sacarosa utilizando una disolución Hoagland II (0.6mM KNO₃, 0.4mM Ca(NO₃)₂ * 4H₂O, 0.1 mM NH₄H₂PO₄, 0.2mM MgSO₄ * 7H₂O, 9x10⁻⁵ mM MnCl₂ * 4H₂O, 46X10⁻⁵ mM H₃BO₃, 8X10⁻⁵ mM ZnSO₄ * 7H₂O, 3X10⁻⁵ mM CuSO₄ * 5H₂O, 1X10⁻⁵ mM H₂MO₄ * H₂O). Para el tratamiento en deficiencia de fosfato se modificó la disolución de Hoagland II, en donde el fosfato de amonio fue cambiado por sulfato de amonio a la misma concentración. Las plantas se trasladaron a cámaras de crecimiento en las condiciones descritas anteriormente. El tratamiento de deficiencia de fosfato se continuó por 10 y 15 días de acuerdo a cada experimento. El material se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -70 °C hasta su uso.

Adicionalmente se germinaron semillas en tierra (Metromix -200) y las plántulas se dejaron crecer por tres semanas en una cámara de crecimiento. Con 3 semanas, las plántulas se trasladaron de manera individual a macetas con agrolita y se regaron cada 3 días con una disolución de Hoagland II. Después de 2 semanas, se inicio el tratamiento de deficiencia de fosfato. Para esto, las plantas se regaron con agua por 4 días, después se regaron con disoluciones de Hoagland II en más y menos fosfato.

3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La clona de cDNA que codifica para la subunidad $\beta\gamma$ se obtuvo del ARC. Para la amplificación de la subunidad se usaron los oligonucleótidos siguientes:

$\beta\gamma$ pGEX forward: 5' GGG GGA TCC ATG TTT GGT TCT ACA TTG 3'

$\beta\gamma$ pGEX reverse: 5' GGG GCG GCC GCT CAA AAG ACC GAG CAG GAA TTG 3'

para caracterizar a las colonias seleccionadas de $\beta\gamma$ -pGEX se utilizaron los oligonucleótidos:

$\beta\gamma$: pGEX reverse: 5' CAA TTC CGT CTC GGT CTT TGA GC GGC CGC 3'

pGEX forward: 5' GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG '

A una alícuota de plásmido ($1\mu\text{L}$) se le añadió buffer 1X, 0.2mM dNTPs, $0.2\mu\text{M}$ de cada oligonucleótido, MgCl_2 $1.5\mu\text{M}$ y 1.5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen), la reacción se llevó a un volumen final de $50\mu\text{L}$. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95°C por 4 minutos, 30 ciclos con periodos de 95°C , 0.5 min; 60°C , 0.5 min; 72°C , 1 min con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

3.3. Preparación y electroforesis de geles de agarosa

Los geles se prepararon con 1 % (w/v) de agarosa en amortiguador TAE 1X (40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA pH 8.0) y bromuro de etidio en concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para la corrida se utilizó amortiguador TAE 1X y Ficoll 10 X como buffer de carga (0.25 % (w/v) azul de bromofenol, 0.25 % (w/v) xilen cianol, 25 % (w/v) Ficoll tipo 400). El gel se corrió a voltaje constante de 70-80 V.

3.4. Purificación de los fragmento de DNA de geles de agarosa

Para la purificación se utilizó el kit: Wizard SV Gel and PCR Clean-up System siguiendo las especificaciones de la casa comercial. El DNA se recuperó en 50 μL de agua libre de nucleasa.

3.5. Ligación de la subunidad AKIN $\beta\gamma$ en el vector pGEM-T easy

Se corrió una reacción de PCR del plásmido que contiene una secuencia parcial del cDNA de AKIN $\beta\gamma$ obtenida de Arabidopsis Research Center y los oligonucleótidos $\beta\gamma$ pGEX forward y reverse. El producto de reacción se aisló de un gel de agarosa. El inserto purificado se ligó en el vector pGEM-T easy. Se colocaron 5 μL del buffer de ligación 2X, 50 ng del vector pGEM-T easy, 50 ng del producto de PCR purificado y 3 u/ μL de T4 DNA ligasa, la mezcla se llevó a 10 μL en agua. La reacción se incubó 1 hora a temperatura ambiente y se almacenó a -20 °C.

3.6. Obtención del vector de expresión pGEX 4T-2

Se sembraron células de *Escherichia coli* que contiene el plásmido pGEX 4T-2 en LB con ampicilina y el plásmido se aisló utilizando un kit Wizard Plus Midipreps DNA purification System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA plasmídico fue digerido con las enzimas Bam HI y Not I durante toda la noche a 37 °C. Después de la digestión, se añadió 1 μL de fosfatasa alcalina y se incubó por 30 minutos a 37 °C. La mezcla se calentó a

70 °C por 5 minutos para detener la reacción. El plásmido linealizado con las dos enzimas de restricción se purificó de un gel de agarosa.

3.7. Ligación de $\beta\gamma$ en el vector de expresión pGEX 4T-2

La ligación entre el fragmento $\beta\gamma$ y pGEX se llevo a cabo con 2 μL del buffer de ligación 10X, 187.5 ng del vector pGEX 4T-2, 200 ng del inserto y 3 u/ μL de T4 DNA ligasa en un volumen final de 20 μL con agua. La reacción se incubó a 14 °C toda la noche y se almacenó a -20 °C.

3.8. Transformación bacteriana

Las células competentes DH5 α y BL21 se descongelaron, se les añadieron 3 μL del plásmido y se colocaron a 4 °C por 15 minutos. Se llevó a cabo un choque térmico a 42 °C por 45 segundos y se dejó por 2 minutos a 4 °C. Se adicionaron 900 μL de medio luria (LB) frío (1% (w/v) Bacto-triptona, 0.5% (w/v) de extracto de levadura, 85 mM NaCl con un pH final de 7.5). Se incubó 1 hora a 37 °C. Toda la reacción se plaqueó en cajas selectivas LB agar con ampicilina (75 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las cajas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

3.9. Aislamiento de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina

El aislamiento se llevo a cabo con el kit Wizard ^R plus Minipreps DNA purification system siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.10. Obtención y purificación de la proteína de fusión

Las colonias $\beta\gamma\text{pGEX}$ BL21 se sembraron en 5 mL de LB con ampicilina y se incubaron a 37 °C con agitación constante toda la noche. Con este cultivo, se inocularon 250 mL de LB con ampicilina y las bacterias crecieron a 37 °C con agitación constante, hasta alcanzar una

densidad óptica de 0.6 a 600 nm. La inducción se realizó añadiendo IPTG a una concentración final de 0.2 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación constante. La muestra se centrifugó a 8000 g por 10 minutos y el paquete celular se resuspendió en 10 mL del buffer de lisis (50 mM HEPES, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF y 1 mM Benzamidina). La muestra se sonicó durante 1 minuto a una amplitud de 40 con pulsos de 2 segundos en Sonics Vibra-Cell 37754 y se centrifugo 10 minutos a 5872 g.

El sobrenadante se incubó con 0.5 mL de la resina glutation-agarosa (previamente equilibrada en el buffer de lisis) durante 1 hora a 4 °C. Después de la incubación, la mezcla se transfirió a una columna cromatográfica y se lavó con 15 mL del buffer de lisis y la proteína de fusión se eluyó con 10 mL del buffer de elusión (pH 8, 10mM glutation y 50 mM HEPES). Se colectaron fracciones de 500 μ L.

La proteína se dializó a 4 °C toda la noche en 1 L de buffer de Tris 10 mM pH 8. Una vez dializada, la muestra se concentró y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

3.11. SDS-PAGE

La electroforesis se realizó de acuerdo a lo descrito por Laemmli (1970). Se preparó un gel concentrador de acrilamida al 4% y un gel separador al 10%. La electroforesis se corrió a 120 V. El gel se tiño con una disolución de Coomassie (50% metanol, 10% ácido acético glacial, brilliant blue (R) 0.625g/L) hasta ver las bandas. Para desteñir el gel, se utilizó una disolución de Metanol 20% y ácido acético 7.5%.

3.12. Generación de anticuerpos contra la proteína GST- $\beta\gamma$

Después de dializar la proteína, se corrieron geles preparativos cargándose 200 μ g de proteína en cada uno. Los geles se tiñeron con una disolución azul de Coomassie en agua (brilliant blue (R) 0.625g /L) hasta visualizar las proteínas. La banda de interés se cortó y guardó en tubos eppendorff a 4°C.

Las tiras de poliacrilamida se molieron en la mínima cantidad de suero fisiológico y se inyectaron a 2 conejos en 5 ocasiones por vía intramuscular y en dos ocasiones por vía intraperitoneal. En total se les inyectaron 450 μg de proteína a cada conejo.

Se hicieron varios sangrados de prueba y el título de los anticuerpos se realizó con el sangrado final.

3.13. Western blot

Se corrió una electroforesis SDS-PAGE y se realizó la transferencia en húmedo a una membrana de nitrocelulosa, Hybond-C Extra Nitrocellulose Suported (Amersham Biosciences), utilizando el sistema Mini Trans-Blot Cell (BIORAD). La transferencia se corrió durante una hora a 100 V en un buffer con 124 mM Tris-HCl, 96 mM de glicina y 20 % v/v metanol. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau S (0.1 % Rojo Ponceau, 5 % ácido acético) para visualizar a las proteínas que fueron transferidas. Para bloquear la membrana, se utilizó una disolución de leche en polvo 5 % en PBST (PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 18 mM, pH 7.3) y Tween 0.5 %). La membrana se incubó toda la noche a 4 °C con el primer anticuerpo (anticuerpos contra GST- $\beta\gamma$ o contra GST) en una disolución bloqueadora. Después de la incubación, la membrana se lavó con PBST durante 15 minutos, seguido por un lavado de 15 minutos con una disolución de 1M NaCl en PBST. El exceso de sales se eliminó con dos lavados finales de PBST.

Para revelar la membrana se usaron dos métodos, por fosfatasa alcalina y por peroxidasa.

3.13.1. Revelado por fosfatasa alcalina

Después de lavar la membrana, se añadió una disolución 1:2000 del segundo anticuerpo, asociado a fosfatasa. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. La membrana se lavó con PBST 2 veces, se realizó un tercer lavado con el buffer para fosfatasa alcaliana (100 mM Tris-HCl, 100mM NaCl; 5mM MgCl pH 9.5) durante 10 minutos. La fosfatasa

asociada al segundo anticuerpo se reveló con una disolución del buffer pH 9.5 y 0.017 mg/mL de BCIP (sal p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato) y 0.033 mg/mL de NBT (cloruro de tetrazolio nitro-azul).

3.13.2. Revelado por peroxidasa

Se añadió una disolución 1: 40000 del segundo anticuerpo asociado a peroxidasa (Amersham) en PBST y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. La membrana se lavó con PBST durante diez minutos con tres cambios. Para revelar, se utilizó el kit ECL Western blotting (Amersham biosciences). La placa fotográfica se expuso de 1 - 20 minutos con la membrana y se reveló en un cuarto oscuro.

3.14. Determinación de la actividad de SnRK1

Se molieron 0.20 g de tejido fresco con 2 mL de buffer de extracción (50 mM Hepes, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Ortovanadato de sodio, 50 mM NaCl, 10 mM β -glicerolfosfato, 8% glicerol, 1 mM Benzamidina, 1mM TT, 1mM PMSF a pH 8.2). La mezcla se centrifugó a 21000 g a 4 °C por 10 minutos. Se agregó PEG 10000 al 11 % durante 20 minutos con agitación suave a 4 °C. Una vez agregado el PEG, la mezcla se dejó agitando a 4 °C por 20 minutos más. La mezcla se centrifugó a 21000 xg a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en 30 μ L de buffer de extracción. Se determinó proteína por el método de Bradford (Bradford M. M., 1976).

Se colocaron 1.5 μ g de proteína con 5 μ L del péptido SAMS 100 μ M, 5 μ g de la disolución de ATP (5 μ L de ATP γ ^{32P} ATP (5 μ Ci/ μ L) se disolvieron en 95 μ L de 75 mM MgCl₂, 20 mM MOPS pH 7.2, 500 μ M ATP, 25 mM β -glicerol fosfato, 1 mM EGTA, 1mM DTT), 5 μ L de buffer de reacción (50 mM Hepes pH 7.8, 50 mM NaF, 0.8 mM EDTA, 50 mM NaCl, 8% glicerol, 5 mM MgCl₂ y 1 mM DTT) y H₂O hasta alcanzar un volumen de 25 μ L. La reacción se incubó 10 minutos a 37 °C.

Para determinar la incorporación de la marca al péptido, se distribuyeron 15 μ L de reacción

en $\frac{1}{4}$ de filtro Whatman p81 y se colocaron en ácido fosfórico 1 %, los filtros se incubaron en ésta disolución por 5 minutos. Se hicieron 2 lavados más con ácido fosfórico 1 % durante 15 minutos, por último, se lavaron con acetona 100 % y se dejaron secar toda la noche.

Para realizar las lecturas, se colocaron los filtros secos en viales con 5 mL de líquido de centelleo. Las lecturas se realizaron por espacio de 2 minutos.

3.15. Identificación de plantas mutantes con inserción de T-DNA en el gen $AKIN_{\beta\gamma}$

Las semillas de las plantas mutantes obtenidas del *Arabidopsis Research Center*, se germinaron y crecieron como se indicó anteriormente.

Se aisló DNA genómico de las hojas de las plantas por medio del kit Extract-N-amp plant PCR kits siguiendo las indicaciones del fabricante. Con el DNA se corrió una reacción de PCR con 3 oligonucleótidos, dos específicos para la subunidad $\beta\gamma$ y otro específico para el T-DNA insertado en las plantas mutantes. Los oligonucleótidos empleados fueron:

Reconocimiento de secuencias en el T-DNA

LBB1: 5' GCG TGG ACC GCT TGC TGC AACT 3'

Reconocimiento de secuencias aleatorias en $\beta\gamma$

LP: 5' GAG AAA GCT CCA AAT CAA CCC 3'

RP: 5' CTC AGG GCA GCT TCT TAC TCC 3'

A 4 μ L de DNA, se añadieron 2 μ L de cada uno de los oligonucleótidos y 10 μ L de la mezcla para PCR que proporciona el KIT. La reacción se llevó a un volumen final de 20 μ . La amplificación se realizó en 35 ciclos con las siguientes condiciones: 95 °C, 0.5 min; 55°C, 0.5 min; 72 °C, 1 min con un tiempo de extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Obtención y caracterización de la subunidad AKIN $\beta\gamma$

El cDNA que codifica para la subunidad AKIN $\beta\gamma$, utilizada en la realización de este trabajo, se obtuvo de *Arabidopsis Research Center*, y corresponde a una secuencia reportada por Kleinow, denominada como *AtSNF4*. Con respecto al cDNA completo, ésta secuencia carece de dos exones y de una región 5' no traducida (UTR) localizados río arriba del predicho codón de inicio ATG (Kleinow *et al.*, 2000; Lumbreras *et al.*, 2001; Gissot *et al.*, 2006).

El gen AKIN $\beta\gamma$ completo contiene 13 exones y 12 intrones codificando un cDNA de 2.3 kb correspondiente a una proteína de 487 amino ácidos cuyo peso aproximado sería de 53 kDa (Gissot *et al.*, 2006) (Figura 4.1).

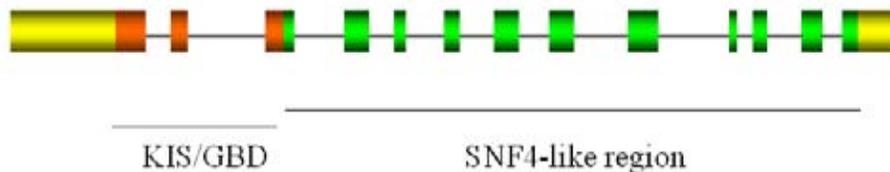


Figura 4.1: Estructura intrón - exón del gen AKIN $\beta\gamma$

Para la amplificación de la subunidad fué necesario diseñar oligonucleótidos específicos, con ellos se corrió una reacción de PCR y el producto se analizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa; en donde, se pudo observar una banda de 1670 pb correspondiente al peso de AKIN $\beta\gamma$. (figura 4.2).

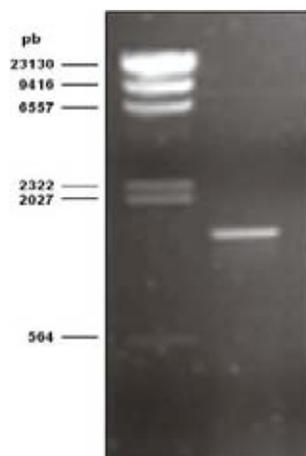


Figura 4.2: Amplificación de la subunidad AKIN $\beta\gamma$

Con la finalidad de llevar a cabo su caracterización, la subunidad AKIN $\beta\gamma$ se purificó directamente del gel y se ligó al vector pGEM-T Easy vector, éste vector presenta resistencia a ampicilina y además contiene al gen LacZ dentro del sitio múltiple del clonación (Figura 4.3).

Con el producto obtenido se transformaron células de *E. coli* DH5 α , como primera selección, las células se hicieron crecer en cajas con ampicilina. En presencia de IPTG y X-gal se obtuvieron colonias de color azul y de color blanco. Las colonias azules corresponden a las células transformadas que lleva el gen funcional que codifica para la proteína β -galactosidasa y produce, por inducción con IPTG, a dicha enzima capaz de hidrolizar a X-Gal y generar la coloración azul. Las colonias blancas corresponden a las células transformadas con el vector que lleva un gen LacZ no funcional debido a la inserción del fragmento $\beta\gamma$.

Se tomaron las colonias de color blanco y se hicieron crecer en LB durante toda la noche, a partir de ellas se aisló el DNA plásmidico, denominado pGEM- $\beta\gamma$, el cual fue digerido con las enzimas BamHI y Not I (Figura 4.4).

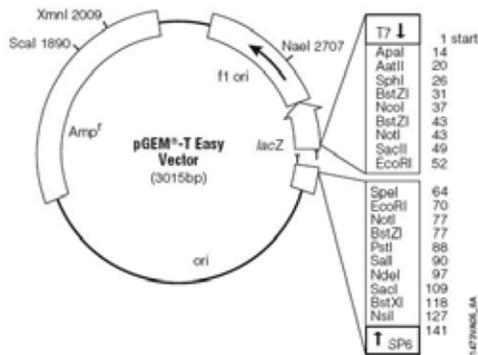


Figura 4.3: Vector utilizado para la caracterización de la subunidad $\beta\gamma$

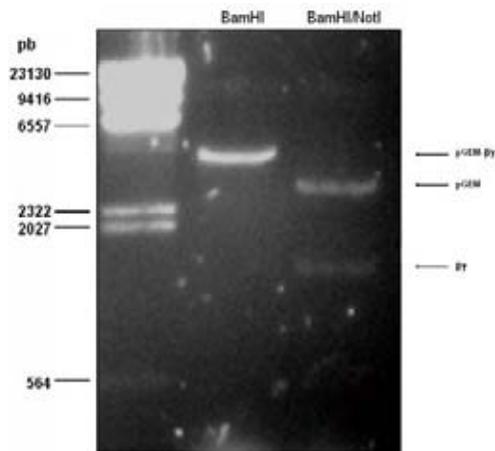


Figura 4.4: Productos de digestión del plásmido pGEM- $\beta\gamma$ con las enzimas BamHI y NotI

Cuando el plásmido se digirió con la enzima BamHI se obtuvo una sola banda de 4685 pb correspondiente al peso del vector más el fragmento de la subunidad $\beta\gamma$. Cuando se digirió con las enzimas BamHI y NotI, se liberó el fragmento clonado obteniéndose dos bandas de 3015 y 1670 pb correspondientes a pGEM y $\beta\gamma$, respectivamente.

los pesos de pGEX y $\beta\gamma$ respectivamente.

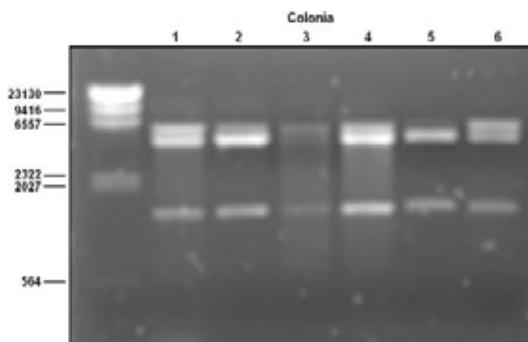


Figura 4.6: Productos de digestión del plásmido pGEX - $\beta\gamma$

4.2.2. Expresión y purificación de la proteína GST- $\beta\gamma$

A partir de la colonia 5 se aisló el plásmido pGEX- $\beta\gamma$ y con él se transformaron células *E. coli* BL21. De las colonias obtenidas se aisló el DNA plásmidico y se caracterizó por medio de reacciones de PCR en donde se amplificó la subunidad $\beta\gamma$ y el fragmento GST- $\beta\gamma$ utilizándose los oligonucleótidos $\beta\gamma$ Reverse/ $\beta\gamma$ forward y $\beta\gamma$ Reverse/GST Forward respectivamente. Los pesos de los fragmentos esperados para cada uno de los pares de oligonucleótidos usados es de 1670 y 1800 pb que coincidió con lo observado en el gel (Figura 4.7).

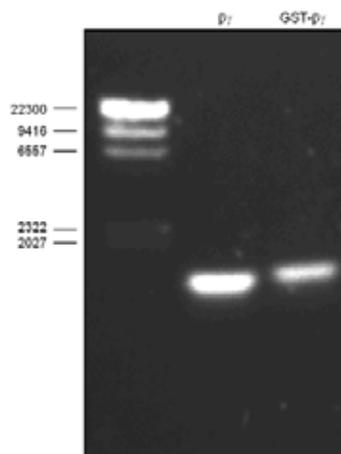


Figura 4.7: Amplificación de los fragmentos $\beta\gamma$ y GST - $\beta\gamma$.

Con las colonias que mostraron amplificación tanto de $\beta\gamma$ como del fragmento GST- $\beta\gamma$ se hicieron inducciones a diferentes tiempos y concentraciones de IPTG. La proteína recombinante se presentó en la fracción soluble después de una inducción de 2 horas a temperatura ambiente utilizando 0.2 mM IPTG.

La proteína de fusión se purificó por cromatografía de afinidad utilizando una resina de glutatión-agarosa como matriz y como eluyente una disolución de glutatión-Tris HCl. La presencia de la proteína recombinante y su purificación fue monitoreada por electroforesis SDS-PAGE. Las proteínas GST y $\beta\gamma$ tienen un peso de 30 y 53 kDa por lo que se esperaba que la proteína de fusión tuviese un peso de 83 kDa.

En la figura 4.8 se muestra el resultado del SDS-PAGE en donde se analizaron muestras que provenían de diferentes pasos de la purificación, en el carril 1, como control, se corrió una muestra de proteínas que provenían de células que no habían sido inducidas, en el carril 2 se analizaron células en donde la proteína se había expresado pero no había sido sometida a ningún tratamiento de purificación. En los carriles restantes se presentan diferentes fracciones de proteína obtenida al eluir a GST- $\beta\gamma$ de la columna glutatión-agarosa (Figura 4.8).

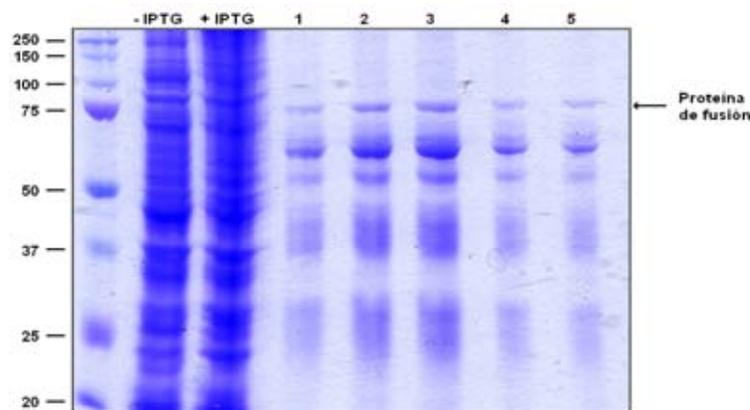


Figura 4.8: Diferentes extractos provenientes de la purificación de GST - $\beta\gamma$.

En el gel, se puede observar una banda de alrededor de 80 kDa que corresponde al peso de la proteína de fusión. Es posible observar varias bandas adicionales que presentan afinidad

por la resina glutatión-agarosa. En la literatura se ha reportado una metodología que permite reducir la afinidad de éstas proteínas con la resina, al emplearla se logró disminuir la presencia de algunas proteínas inespecíficas, pero el rendimiento de GST- $\beta\gamma$ se afectó.

Para demostrar que la proteína obtenida correspondía a GST- $\beta\gamma$, se realizó un ensayo tipo Western blot con anticuerpos anti-GST y las fracciones obtenidas de la columna de glutatión-agarosa (Figura 4.9).

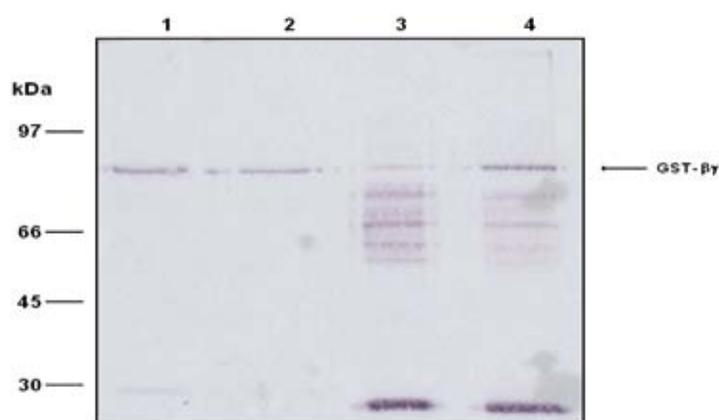


Figura 4.9: Western blot utilizando anticuerpos específicos anti-GST

El anticuerpo reconoce a una proteína con un peso aproximado de 83 kDa, que coincide con el peso esperado de la proteína de fusión. Además, en las últimas fracciones de la elusión se observaron bandas por debajo del peso de la proteína de fusión. Estas bandas, podrían corresponder a productos de degradación.

Las muestras que contenían a la proteína GST- $\beta\gamma$ se dializaron, concentraron y fueron guardadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

4.3. Obtención y caracterización de los anticuerpos anti-AKIN $\beta\gamma$

4.3.1. Inmunización de los conejos

Las muestras de proteína almacenadas a -70°C se resuspendieron en agua para determinar su concentración por medio del método de Bradford. Con estas muestras se corrieron SDS-PAGE en geles preparativos con $200\ \mu\text{g}$ de proteína total, los geles se tiñeron con azul de Comassie en agua hasta que la banda correspondiente a GST- $\beta\gamma$ fuera visible. El fragmento de gel que contenía a la proteína de fusión se cortó y almacenó a 4°C .

Los trozos de gel fueron molidos en la mínima cantidad de suero fisiológico y la suspensión obtenida se utilizó para inmunizar a los conejos. Se inyectaron $250\ \mu\text{g}$ de proteína a cada conejo de manera intramuscular en un periodo de 3 semanas y se extrajo sangre de cada animal para probar el título. Debido a que el suero proveniente de ambos conejos tuvo un reconocimiento débil por la proteína de fusión, se decidió inyectar $100\ \mu\text{g}$ de proteína en dos ocasiones más vía intraperitoneal. En total se inyectaron $450\ \mu\text{g}$ de proteína.

A los tres días posteriores a las inyecciones, a cada conejo se les extrajeron $40\ \text{mL}$ de sangre. El suero se aisló y se guardó a -20°C .

4.3.2. Caracterización de los anticuerpos obtenidos

Como control, se realizaron ensayos Western blot con el suero preinmune obtenido de cada animal. Se corrió un SDS-PAGE preparativo con $300\ \mu\text{g}$ de proteína de fusión. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de los sueros preinmunes (Figura 4.10 A).

Los resultados indicaron que el suero preinmune del conejo A reconoce a una proteína inespecífica que posee un peso aproximado de $75\ \text{kDa}$, éste reconocimiento se dió cuando el anticuerpo fue utilizado a concentraciones superiores a $1/500$ (v/v). El suero preinmune del conejo B no reconoció ninguna proteína y por tal motivo se decidió utilizar únicamente los anticuerpos provenientes del conejo B.

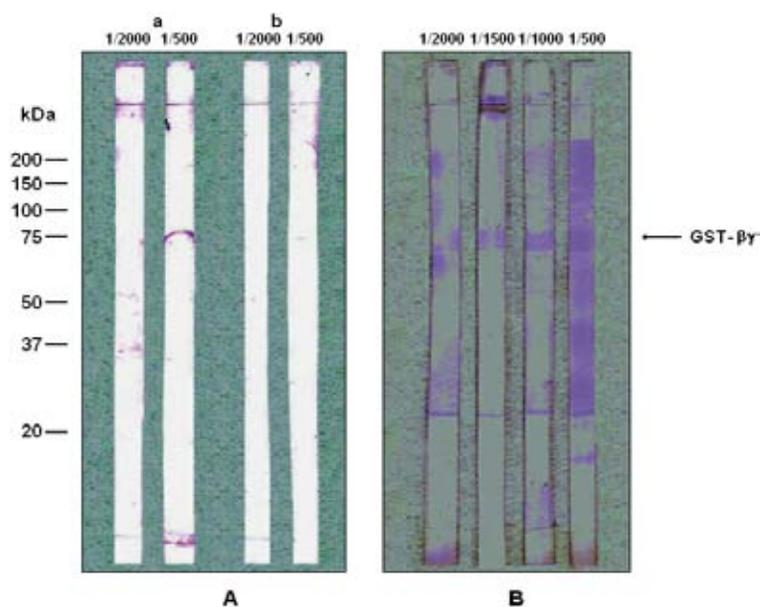


Figura 4.10: A: Western blot con los sueros preinmunes de ambos conejos. B: Western blot con el anticuerpos anti- $\beta\gamma$ a diferentes concentraciones

Para determinar si el suero inmune reconoce a la proteína de fusión, se realizaron ensayos tipo Western blot con diferentes diluciones del suero (Figura 4.10 B) y muestras provenientes de la purificación. Se puede observar que el anticuerpo reconoce a la proteína de fusión aún cuando se utiliza a una concentración 1:2000, también muestra que hay un reconocimiento por una proteína de 30 kDa, que podría corresponder a GST.

4.4. Localización de la subunidad AKIN $\beta\gamma$

4.4.1. Localización celular

Una vez obtenidos y caracterizados los anticuerpos anti $\beta\gamma$, se realizaron ensayos tipo Western blot con muestra proveniente de diferentes tejidos con el fin de conocer en cual de ellos se expresaba la proteína. En el estudio se analizaron hojas, flores, raíces y silicuas. Únicamente en el extracto proveniente de las hojas se observó el reconocimiento de una proteína; sin embargo, éste fue débil (datos no mostrados).

Al analizar las características de la secuencia de amino ácidos de la subunidad $\beta\gamma$ con en

el programa Chloro P, se encontró una secuencia, hacia la región amino terminal, que sugería que la proteína podría tener una localización cloroplástica. Para demostrar ésto, proteínas de cloroplasto, proporcionadas por la Dra. Coello, se separaron por medio de un SDS-PAGE junto con proteínas de un extracto total de hojas (Figura 4.11A). Con éstas proteínas, se realizó un ensayo tipo Western blot utilizando el anticuerpo anti- $\beta\gamma$ obtenido (Figura 4.11B).

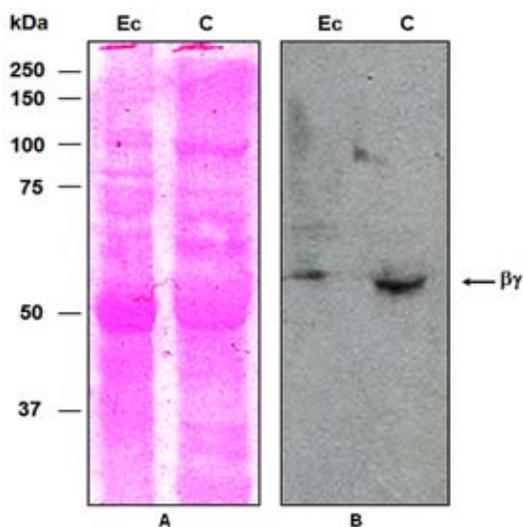


Figura 4.11: Western blot con proteína extraída de hojas (Ec) y cloroplasto (C). A) Membrana teñida con rojo de Ponceau, B) Western blot utilizando anticuerpos anti- $\beta\gamma$

Como se observa, el anticuerpo contra $\beta\gamma$ reconoció a una proteína, de 54 kDa, en el extracto crudo y en la fracción cloroplástica, ésta última con más intensidad (Figura 4.11 B) se observó una cantidad mayor de la proteína en la fracción cloroplástica. Entre la proteína reconocida en el extracto crudo y la fracción cloroplástica existe una diferencia en tamaños, siendo menor en la última fracción. Ésta diferencia podría corresponder a la pérdida del péptido señal predicha por el programa en el que se analizó a la subunidad que es aproximadamente de 7 kDa.

4.4.2. Localización subcelular

Para determinar la localización subcelular de AKIN $\beta\gamma$ se realizaron inmunolocalizaciones utilizando tejido de plantas tipo silvestre sometidas a estrés nutrimental por deficiencia de

Pi (Figura 4.12). Las inmunolocalizaciones fueron realizadas en el y las plantas crecidas bajo condiciones óptimas en el laboratorio de desarrollo en plantas de la Facultad de Ciencias de la UNAM por la Dra. Sonia Vázquez. En la figura 4.12 se puede observar, en la primera columna, la fluorescencia dada por el segundo anticuerpo unido al anti- $\beta\gamma$ y por tanto corresponde a la localización de AKIN $\beta\gamma$, en la segunda se observa la fluorescencia de la clorofila y por último se tiene una imagen en la región del visible. Las dos primeras filas corresponden a una amplificación de 60X y las dos últimas a una amplificación 20X.

Al sobreponer las imágenes dadas por la clorofila y por la señal correspondiente a $\beta\gamma$ se tiene una alta coincidencia por lo tanto, se puede ratificar que la subunidad AKIN $\beta\gamma$ se encuentra en el cloroplasto.

Cuando se analizaron plantas que fueron sometidas a estrés por deficiencia de fosfato se observó que no hay una relocalización de la subunidad; sin embargo, la cantidad de proteína disminuyó. Ésta disminución no nos permite identificar si hay un abatimiento en la expresión de la subunidad AKIN $\beta\gamma$ ya que, como ha sido reportado en la literatura, la deficiencia de Pi causa una baja en la cantidad de cloroplastos (Marschner H., 1995).

4.5. Formación de posibles complejos funcionales con AKIN $\beta\gamma$

Con el fin de conocer si la subunidad AKIN $\beta\gamma$ interactúa con las subunidades catalíticas KIN10 y KIN11, se hicieron inmunoprecipitaciones utilizando tejido de hoja proveniente de plantas que sobreexpresan a las subunidades catalíticas.

Para medir la interacción entre la subunidad KIN10 y $\beta\gamma$ se realizaron inmunoprecipitaciones utilizando un extracto proveniente de plantas que expresan KIN10 fusionada a la proteína GFP y anticuerpos anti- $\beta\gamma$. Los inmunocomplejos se separaron en un SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Ésta membrana se reveló con anticuerpos anti- α . Los anticuerpos identificaron una sola banda de 90 kDa que corresponde a la subunidad KIN10 fusionada con GFP (Figura 4.13A). Como control se realizaron inmunoprecipitaciones con el anticuerpo anti- α revelando con el mismo anticuerpo, lo que indentificó una banda del mismo peso molecular.

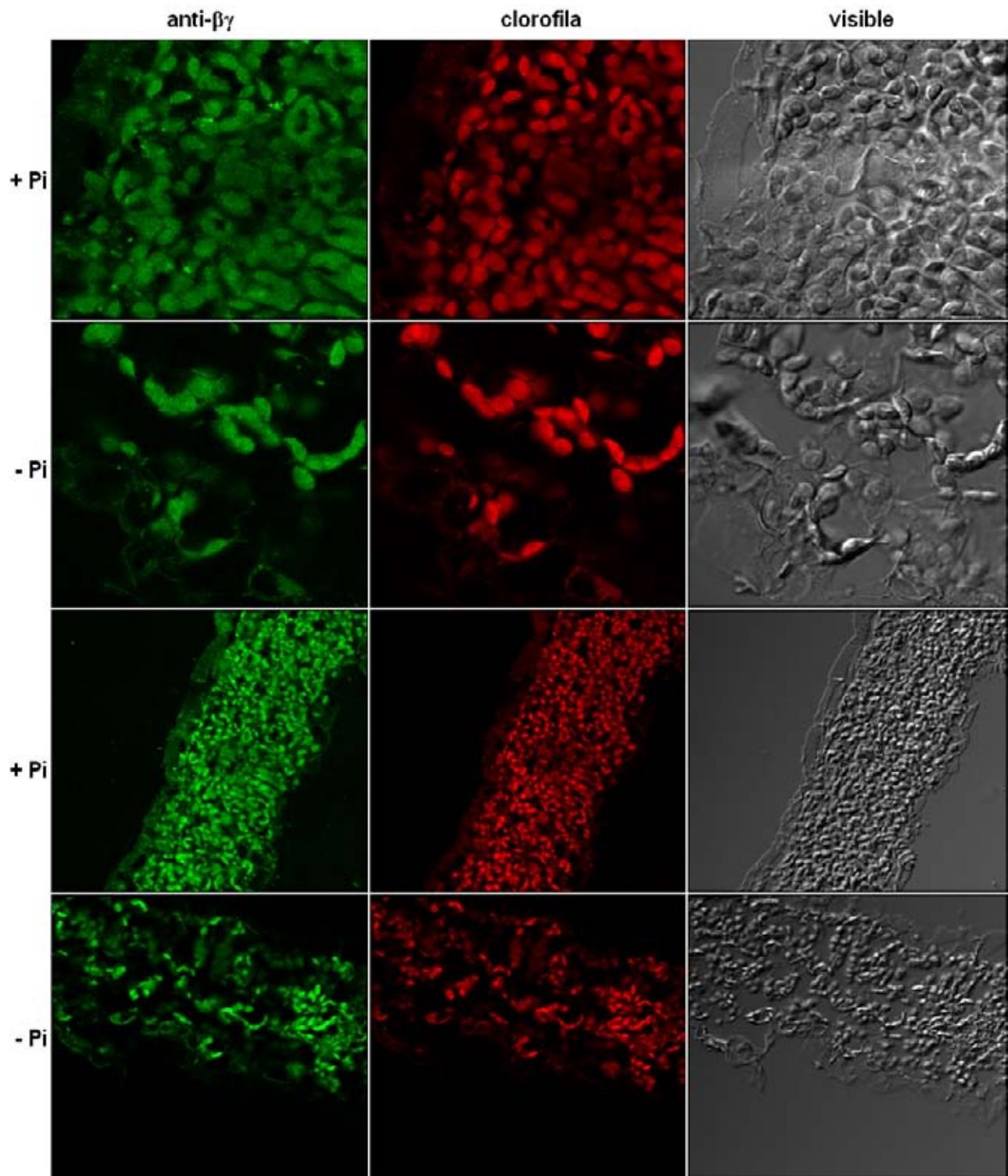


Figura 4.12: Inmunolocalizaciones en plantas tipo silvestres -Pi y +Pi

La interacción entre la subunidad KIN11 y $\beta\gamma$ se evaluó a partir de extractos de hojas de plantas que expresan KIN11-GFP. Se realizaron inmunoprecipitaciones con un anticuerpo anti-GFP. Con los inmunoprecipitados se realizó un Western blot revelando con el anticuerpo anti- $\beta\gamma$. En la membrana se observó una banda de 53 kDa que corresponde a la subunidad AKIN $\beta\gamma$ (Figura 4.13 B).

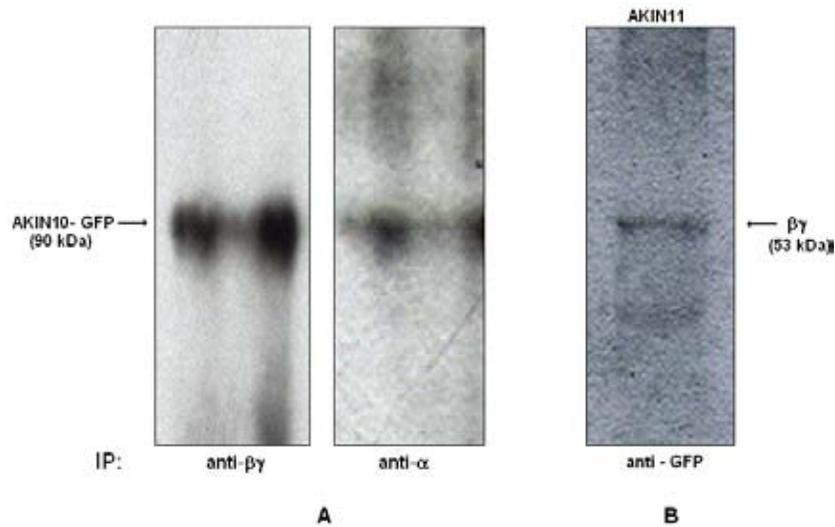


Figura 4.13: Interacción de la subunidad AKIN $\beta\gamma$ con las subunidades AKIN10 y AKIN11

4.6. Interacción de la proteína AKIN $\beta\gamma$ con gránulos de almidón

De acuerdo con lo que se ha reportado en la literatura, la SnRK1 podrían estar participando activamente en la regulación del metabolismo de carbohidratos, como sucede con sus ortólogas en levaduras y animales.

La subunidad AKIN $\beta\gamma$ presenta una estructura relacionada a las subunidades γ pero contiene un dominio GBD relacionado a las subunidades β , el cual se ha determinado, es un sitio de unión a glicógeno en mamíferos (Polekhina *et al.*, 2003). Recientemente se ha postulado que éste dominio presente en AKIN $\beta\gamma$ podría ser un dominio de unión a almidón (SBD) (Hardie 2007). Para determinar si la subunidad AKIN $\beta\gamma$ interactúa con los gránulos de almidón, se sembraron

plantas tipos silvestre (WT) y plantas mutantes que carecen de la subunidad catalítica KIN10 (*a10*). Las plantas fueron cosechadas a diferentes tiempos, después de un periodo de oscuridad (O) y después un periodo de luz (L). El grupo del Dr. Martínez aisló los gránulos de almidón de éstas plantas y las proteínas que se encuentran asociadas a ellos. Éstas proteínas se separaron por medio de una electroforesis SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Con la membrana obtenida, se realizaron ensayos tipo Western blot utilizando anticuerpo anti- $\beta\gamma$ y anti- α (Figura 4.14). Cuando la muestra protéica se reveló con los anticuerpos anti- $\beta\gamma$, se observó una sola banda, siendo más intensa en la fracción proveniente de plantas tipo silvestre cosechadas después de un periodo de luz (L). La señal disminuyó cuando se analizaron las plantas *a10*. Con respecto a las plantas que fueron cosechadas después de un periodo de oscuridad (O), se observó el mismo comportamiento, una disminución en la cantidad de proteína en las plantas *a10* con respecto a las silvestres.

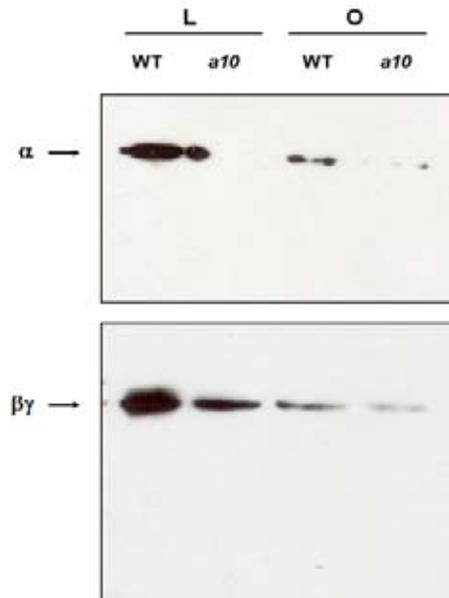


Figura 4.14: Interacción de las subunidades catalíticas y AKIN $\beta\gamma$ con almidón. Se evaluaron proteínas asociadas al almidón en plantas WT y *a10* en luz (L) y oscuridad (O)

Al utilizar los anticuerpos anti- α se observó que la cantidad de proteína en las plantas silvestres disminuía en el periodo de oscuridad. En las plantas *a10* se observó que la cantidad de proteína es casi nula en ambos periodos (Figura 4.14).

4.7. Plantas mutantes $\beta\gamma$

Con la finalidad de conocer la función de la subunidad $\beta\gamma$, se decidió trabajar con plantas que tienen una inserción de T-DNA dentro del segundo intrón del gen de AKIN $\beta\gamma$ (Figura 4.15).

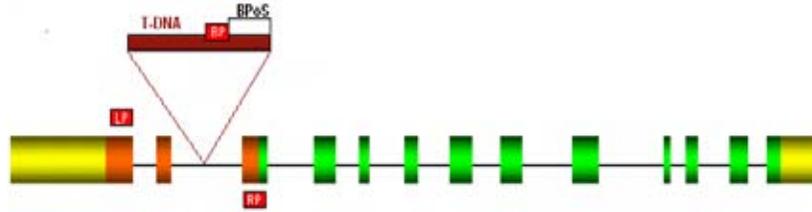


Figura 4.15: Modelo de amplificación del gen $\beta\gamma$ en plantas silvestres y heterocigotas.

4.7.1. Caracterización de las plantas

Para caracterizar a las plantas mutantes se extrajo el DNA de cada una de ellas y se corrieron reacciones de PCR utilizando 3 oligonucleótidos, dos de ellos, el RP y LP, amplifican una región del gen de $\beta\gamma$ que no ha sido modificado, mientras que el BP se encuentra dentro de la región del T-DNA, por lo tanto, se esperaba observaren las plantas silvestres, una sola banda con un peso mayor a 500 pb y para las plantas homocigotas, una sola banda con un peso de alrededor de 250 pb. Para las plantas heterocigotas se esperaba la amplificación de ambas bandas. Como control, se corrió una reacción de PCR con DNA proveniente de plantas silvestres en donde solo se amplificaría una banda (Figura 4.16). Todas las plantas analizadas presentaron ambas bandas, indicando que son heterocigotas. Después del análisis de más de 100 plantas, no se pudo obtener a una que fuese homociga, lo que indicaría que el gen es muy importante para el desarrollo de la planta y probablemente su mutación es letal.

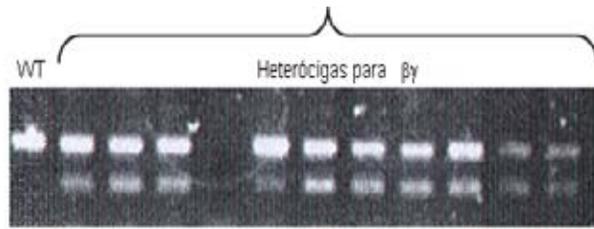


Figura 4.16: Amplificación del gen $\beta\gamma$ en plantas silvestres y heterocigas.

4.7.2. Caracterización de las plantas heterocigas para $\beta\gamma$

Al no obtener una planta que fuese homociga, se decidió estudiar a las plantas heterocigas. Entre las plantas tipo silvestre y las mutantes heterocigas hubo diferencias en el crecimiento durante el primer mes, las plantas heterocigas presentaron un crecimiento más lento, en general, eran más pequeñas en comparación con las plantas silvestres bajo las mismas condiciones y periodo de luz (Figura 4.17). En la edad adulta ya no se encontró diferencias en tamaño.

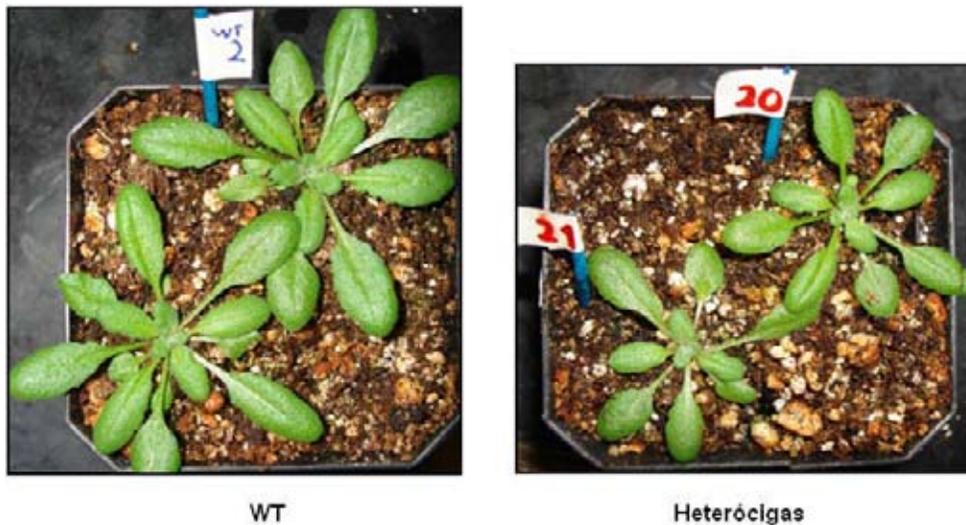


Figura 4.17: Diferencias en el crecimiento entre las plantas heterocigas y las del tipo silvestre.

4.7.3. Determinación de la actividad de SnRK1

Para determinar si existe alguna modificación en la actividad de SnRK1 en plantas heterocigas, se evaluó su capacidad de fosforilación del péptido SAMS, péptido específico para este tipo de cinasas (Figura 4.18).

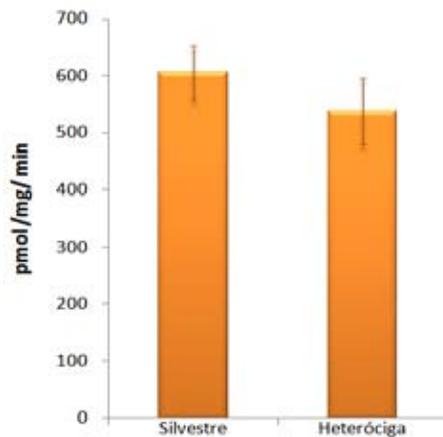


Figura 4.18: Actividad de SnRK1 en las plantas de tipo silvestre y heterocigas

Los resultados indicaron que no existen diferencias en la actividad de cinasa entre las plantas silvestres y las mutantes heterocigas.

4.8. Efecto de la deficiencia de Pi.

Debido a que no hay diferencias entre las plantas silvestres y heterocigas en condiciones normales, se decidió estudiar su comportamiento cuando son sometidas a estrés por deficiencia de fosfato.

4.8.1. Caracterización de las plantas sometidas a estrés

Los resultados indican que la deficiencia de fosfato dificulta el desarrollo de la planta. Al comparar las plantas silvestres con las heterocigotas en las mismas condiciones nuevamente se

observó que éstas últimas tienen un desarrollo más lento, pero no existen diferencias fenotípicas importantes entre ambas plantas.



Figura 4.19: Hojas de las plantas silvestre y heteróciga en deficiencia y suficiencia nutrimental a 20 días de tratamiento

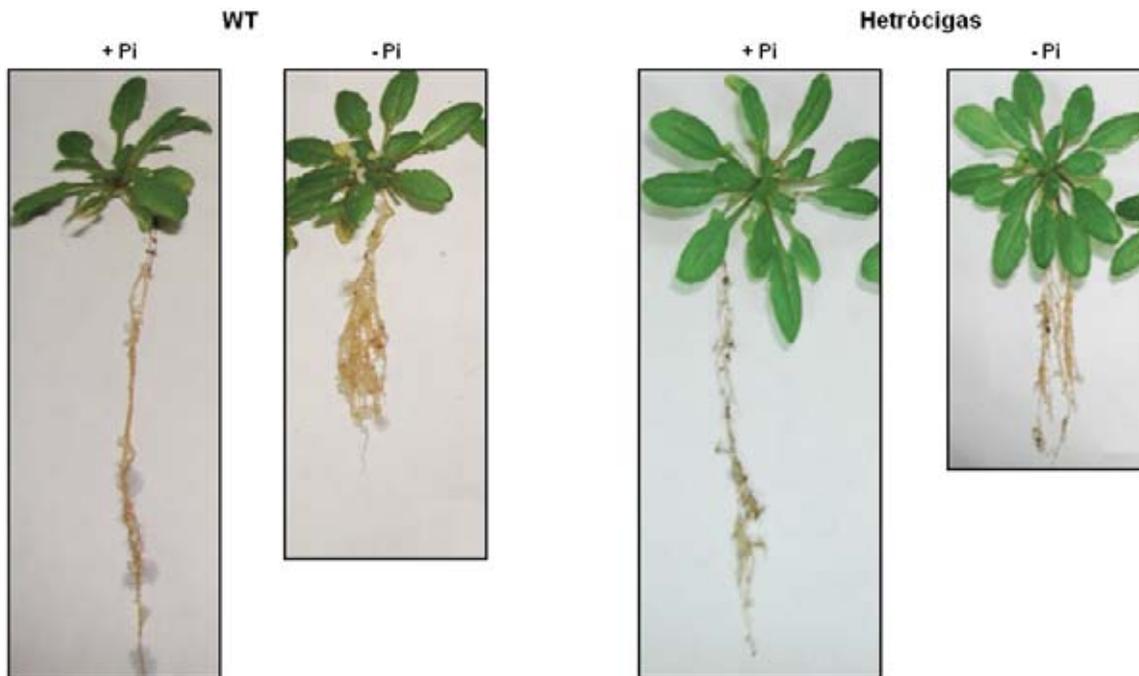


Figura 4.20: Vista general de las plantas en deficiencia y suficiencia de fosfato a 10 días de tratamiento

Para conocer las modificaciones que sufren las plantas cuando son sometidas a estrés, se estudiaron los cambios que presentan en su arquitectura. Como ya se ha reportado en la literatura,

la deficiencia de fosfato modificó la arquitectura radical en las plantas silvestres y mutantes. Dentro de los cambios morfológicos, se observó una disminución en el tamaño de la roseta y una coloración verde oscura (Figura 4.19). En la raíz se observó un aumento en la longitud y densidad de los pelos radiculares y la proliferación de raíces laterales (Figura 4.20).

4.8.2. Determinación de la actividad de SnRK1

Para determinar si hay una diferencia en la actividad de SnRK1 cuando las plantas son sometidas a deficiencia nutrimental, se tomó tejido de las plantas bajo tratamiento de 20 días y se midió la actividad de cinasa (Figura 4.21).

Los resultados indicaron que tanto en las plantas heterocigas, como las silvestres mostraron una disminución en la actividad de la cinasa cuando son sometidas a deficiencia de fosfato. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre las plantas silvestres y las heterocigotas al compararlas entre sí.

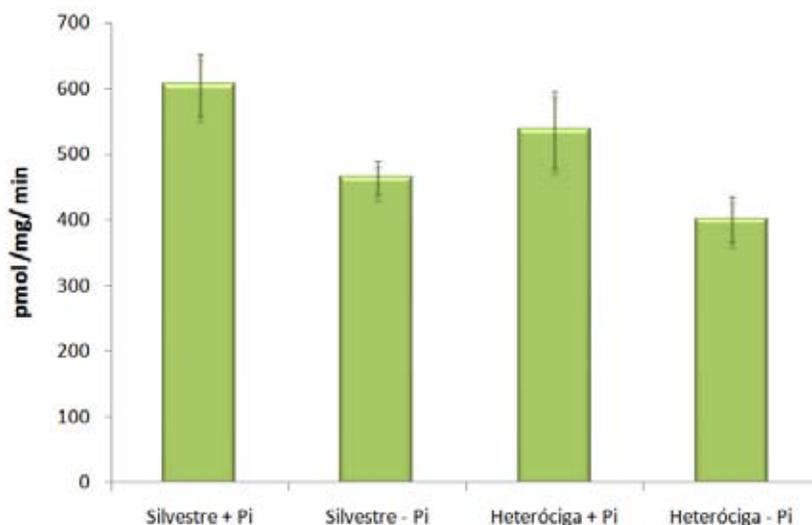


Figura 4.21: Diferencias en la actividad entre plantas heterocigas para $\beta\gamma$ y WT crecidas en deficiencia de Pi

Capítulo 5

Análisis de resultados

Los primeros datos obtenidos sobre la subunidad $\beta\gamma$ fueron descritos en maíz, en donde se identificó a una subunidad que presenta, hacia la región amino terminal un dominio KIS característicos de las subunidades β y, hacia el extremo carboxilo terminal, dos dominios Bateman descritos para las subunidades γ , éstas subunidades fueron denominadas ZmAKIN $\beta\gamma$ -1 y -2 (Lumbreras *et al.*, 2001). En *A. thaliana* el homólogo de éstas subunidades es AKIN $\beta\gamma$. El objetivo de ésta tesis fue estudiar a AKIN $\beta\gamma$, su localización, formación de complejos y su papel en el metabolismo de carbohidratos.

La secuencia AtSNF4 se clonó dentro de un vector de expresión y con la proteína obtenida se generaron anticuerpos específicos anti- $\beta\gamma$. En el tiempo en que éste trabajo se realizó, estudios sobre el gen codificante para AKIN $\beta\gamma$ demostró que la secuencia descrita por AtSNF4 no corresponde al gen completo. AtSNF4 carece de dos exones y una región 5' no traducida localizada río arriba del primer ATG, secuencia correspondiente al dominio KIS/GBD (Kleinow *et al.*, 2000; Gissot *et al.*, 2006).

Como primera aproximación para determinar la localización de $\beta\gamma$ se realizaron ensayos tipo Western blot con extractos de diferentes tejidos. Únicamente en los extractos de hojas se observó una banda de aproximadamente 54 kDa que concuerda con el peso predicho para la proteína AKIN $\beta\gamma$ que es de 53 kDa. Se ha descrito que el gen codificante para AKIN $\beta\gamma$ puede sufrir un corte alternativo del intrón 10 produciendo una proteína de 43.3 kDa, carente

del dominio CBS4, denominada AKIN $\beta\gamma$ I, (Gissot *et al.*, 2006); sin embargo, en ninguno de nuestros ensayos se observó ésta proteína.

AKIN $\beta\gamma$ ha sido localizada en el citoplasma y núcleo (Gissot *et al.*, 2006) pero estudios de los dominios de unión a carbohidratos sugiere que podría estar localizada en el cloroplasto (Kerk *et al.*, 2006). El análisis de la secuencia de AKIN $\beta\gamma$ en el programa Chloro P indicó que existe una secuencia, hacia la región amino terminal, que sugiere la localización cloroplástica. El análisis de las proteínas presentes dentro del cloroplasto permitió demostrar la localización de la subunidad AKIN $\beta\gamma$ dentro de ellos. En el extracto cloroplástico es posible observar una banda con el peso aproximado de $\beta\gamma$. El tamaño de la proteína identificada en el extracto cloroplástico es menor que el observado en el extracto crudo, ésta diferencia, de aproximadamente 7 kDa, podría corresponder a la pérdida del péptido señal. Por medio de estudios de inmunolocalización utilizando anticuerpos específicos contra $\beta\gamma$ se confirmó la presencia de la subunidad reguladora dentro de los cloroplastos.

Se ha demostrado que la subunidad AKIN $\beta\gamma$ interacciona con la subunidad catalítica AKIN11 a través del dominio KIS, sin la necesidad de una subunidad β (Lumbreras *et al.*, 2001). A pesar de éstos datos que señalan la posible formación de un heterodímero, se ha demostrado, *in vitro*, que AKIN $\beta\gamma$ interacciona con las tres subunidades β (Gissot *et al.*, 2006). Éstos datos no excluyen la existencia de un complejo heterodimérico conformado por la subunidad AKIN $\beta\gamma$ y una de las subunidades catalítica pero sugiere la existencia de complejos heterotriméricos conformados por una subunidad catalítica, una subunidad β y AKIN $\beta\gamma$ (Gissot *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en éste trabajo señalan que AKIN $\beta\gamma$ interacciona con AKIN10 y AKIN11 sugiriendo la formación de complejos con ambas subunidades catalíticas.

Se ha descrito que el homólogo de SnRK1 en mamíferos, AMPK, está involucrado en el metabolismo de glucógeno (Hudson *et al.*, 2003). La interacción entre el complejo AMPK y el glucógeno se da a través del dominio GBD presente en las subunidades β (Polekhina *et al.*, 2003; Polekhina *et al.*, 2005a; Polekhina *et al.*, 2005b; Hudson *et al.*, 2006). El papel de éste complejo en el metabolismo de glucógeno se hace más evidente al analizar enfermedades relacionadas

con el almacenamiento de éste carbohidrato, en donde existen mutaciones en AMPK γ 2. Estas mutaciones interfieren en la unión de AMP al complejo reduciendo o aboliendo la activación debida a éste nucleótido (Scott *et al.*, 2004; Daniel y Carling, 2002). En plantas las subunidades β y $\beta\gamma$ podrían desempeñar un papel semejante a su homólogo de mamíferos (Polekhina *et al.*, 2005b). Debido a la ausencia de glucógeno en plantas, se ha propuesto que la unión podría darse con el almidón. En éste trabajo se demostró que las subunidades AKIN $\beta\gamma$ y AKIN10 se encuentran dentro de las proteínas asociadas a los gránulos de almidón y su presencia disminuye en los periodos de oscuridad. Éste descenso podría deberse a que es en éste periodo cuando los niveles de almidón disminuyen. El análisis de las proteínas asociadas a los gránulos de almidón en plantas con inserción de T-DNA en AKIN10, indicó que ésta subunidad catalítica es la que interactúa con el almidón y no AKIN11. Datos obtenidos sobre la localización de las subunidades AKIN10 y AKIN11 indicaron que ambas subunidades están localizadas en el cloroplasto (Fragoso, datos no publicados); sin embargo, ninguna de ellas posee un péptido señal que indique su presencia dentro de ellos. Con los datos obtenidos en éste trabajo que demuestra la interacción de AKIN $\beta\gamma$ con AKIN10 y AKIN11, nos permite proponer que es a través de su interacción con la subunidad reguladora, que ambas subunidades catalíticas llegan al cloroplasto y en el caso de AKIN10, su interacción con AKIN $\beta\gamma$ podría estar mediando su interacción con los gránulos de almidón.

El análisis de plantas en donde la expresión de $\beta\gamma$ se reduzca, podría arrojar datos sobre el papel que desempeña ésta proteína. Por ello se analizaron plantas que presentan una inserción de T-DNA dentro del gen codificante para AKIN $\beta\gamma$. Después de analizar varias plantas, provenientes de diferentes generaciones filiales, no fue posible obtener una línea homociga, esto sugiere que AKIN $\beta\gamma$ tiene un papel importante durante el desarrollo de las plantas y, probablemente, su ausencia resulta letal para ellas.

Otro tema estudiado fue el efecto de la deficiencia de Pi, problema universal al que se ven sujetas las plantas (Sachtman *et al.*, 1999). Se ha demostrado que diversos genes se ven alterados durante éste tipo de estrés, uno de ellos, codifica para una proteína que forma parte

del complejo SnRK1 (Coello, datos no publicados). En éste trabajo se analizaron las posibles modificaciones que sufre la proteína AKIN $\beta\gamma$ en plantas cultivadas en un medio deficiente de Pi. El análisis de inmunolocalización con anticuerpos específicos anti- $\beta\gamma$ en plantas silvestres, sometidas a la deficiencia de Pi, mostró que no existen alguna alteración en la localización de la proteína cuando la planta es sometida a éste tipo de estrés; sin embargo, no fue posible determinar si existen alteraciones en la expresión de AKIN $\beta\gamma$. El análisis entre las plantas heterocigas para $\beta\gamma$ y tipo silvestre sometidas a deficiencia de Pi indicó que no existen diferencias en el fenotipo, ambas presentaron la morfología característica: inhibición del crecimiento de la raíz principal, crecimiento de raíces secundarias y pelos radiculares, disminución del tamaño de las hojas y coloración verde oscuro de éstas (Raghotgama, 1999; Singer y Munns, 1991; Williamson *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2003). En cuanto a la actividad del complejo, datos obtenidos anteriormente muestran que en plantas bajo deficiencia de Pi existe una disminución en la actividad de SnRK1 que se hace más evidente en las plantas con inserción de T-DNA en AKIN10 (Fragoso, datos no publicados). Los datos obtenidos en éste trabajo mostraron la misma tendencia. El análisis de las plantas heterocigas para $\beta\gamma$ muestra que para éstas plantas la disminución en la actividad de SnRK1 bajo deficiencia de Pi es más pronunciada. No obstante, no se pudo demostrar que en plantas heterocigas existiera una disminución en la proteína AKIN $\beta\gamma$.

Capítulo 6

Conclusiones

- ★ Se expresó la subunidad AKIN $\beta\gamma$.
- ★ Se obtuvieron anticuerpos específicos contra la proteína AKIN $\beta\gamma$.
- ★ La proteína AKIN $\beta\gamma$ está localizada en el cloroplasto.
- ★ AKIN $\beta\gamma$ se encuentra asociada a los gránulos de almidón.
- ★ No fue posible obtener plantas homocigas con inserción de T-DNA dentro del gen codificante para AKIN $\beta\gamma$.
- ★ No existen diferencias fenotípicas en plantas heterocigas para $\beta\gamma$ y WT cuando son sometidas a una deficiencia de fosfato.
- ★ La actividad del complejo SnRK1 disminuye en condiciones de deficiencia de fosfato y la disminución es más pronunciada en plantas heterocigas para AKIN $\beta\gamma$.

Bibliografía

Baena-González E., Rolland, F., Thevelein J. and Sheen J. (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 10: 1-6.

Bhalerao R. P., Salchert K., Bako L., Ogres L., Szbados L., Muranaka T., Machida Y., Schell J. and Koncz C. (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 5322-5327.

Bouly J.P., Gissot L., Lessard P., Kreis M. and Thomas M. (1999) *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINalpha1, and SNF1-like protein kinase. *Plant J*; 18: 541-550.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*; 72: 248-254.

Buitink J., Thomas M., Gissot L. And Leprince O. (2003) Starvation, osmotic stress and desiccation tolerant lead to expression of different genes of the regulatory β and γ subunits of the SnRK1 complex in germinating seeds of *Medicago truncatula*. *Plant Cell and Environ*; 27: 55-67.

Camacho Y., Martínez-Casilla L., Fragoso S., Vázquez S., Martínez-Barajas E. and Coello P. (2008) Characterization of a type A response regulator in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in response to phosphate starvation. *Physiol Plant*; 132: 272-282.

Carlson M. (1999) Glucosa repression in yeast. *Curr Op Plant Biol*; 2: 202-207.

Dale S., Arro M., Becerra B., Morrice N. G., Boronat A., Hardie D. G. and Ferrer A. (1995a) Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by Brassica oleracea 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem*; 233: 506-513.

- Dale S.** (1995b) Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. *FEBS Lett*; 361: 191-195.
- Daniel T. D. and Carling D.** (2002) Functional analysis of mutations in the γ 2 subunit of AMP-activated protein kinase associated with cardiac hypermetrophy and Wolff-Parkinson-White syndrome. *J Biol Chem*; 277: 51017-51024.
- Duff S. M. G., Lefebvre D. D. and Plaxton W. C.** (1989) Purification and characterization of a phosphoenolpyruvate phosphatase from *Brassia nigra* suspension cells. *Plant Physiol*; 90: 734-741.
- Duff S. M. G., Sarath G. and Plaxton W. C.** (1994) The role of acid phosphorus metabolism. *Physiol Plant*. 90: 781-800.
- Epstein E.** (1972) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. *Wiley* New York.
- Ferrando A, Koncz-Kálmán Z, Farrás R, Tiburcio A.** (2001) Detection of in vivo protein interactions between Snf1-related kinase subunits with intron-tagged epitope-labelling in plants cells. *Nucleic Acids Res*; 29: 3685-3693.
- Furihata T., Suzuki M. and Sakura H.** (1992) Kinetic characterization of two phosphate system with different affinities in suspension *Catharanthus roseus* protoplas. *Plant Cell Physiol* 33: 1151-1157.
- Gancedo J. M.** (1998) Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiol Mol Biol*; Rev 62: 334-361.
- Gissot L., Polge C., Bouly J. P., Lemaitre T., Kreis M., Thomas M.** (2004) AKIN β 3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic β -subunits. *Plant Mol Biol*; 56. 747-759.
- Gissot L., Polge C., Jossier, M., Girin T., Bouly J.P., Kreis M. and Thomas M.** (2006) AKIN $\beta\gamma$ contributes to SnRK1 heterotrimeric complex and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiol*; 142: 931-944.
- Grossman A. and Takahashi H.** (2001). Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 52: 163-210.
- Halford N. G. and Hardie G.** (1998) SNF1-related protein kinase: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol* 37: 735-748.

- Halford N. G. and Matthey J. P.** (2003a) Carbon metabolite sensing and signalling. *Plant Biotechnology J* 1: 381-398.
- Halford N. G., Hey S., Jhurrea D., Laurie S., McKibbin R., Paul M. and Zhang Y.** (2003b) Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related protein kinase. *Journal of experimental Botany* 54: 382-475.
- Halford N. G., Hey S., Jhurrea D., Laurie S., McKibbin R. S., Zhang Y. and Paul M. J.** (2004) Highly conserved protein kinases involved in the regulation of carbon and amino acid metabolism. *J Exp Bot* 55: 35-42.
- Hao L., Wang H., Sunter G. and Bisaro D. M.** (2003) Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivated SNF1 kinase. *Plant Cell*; 15: 1034-1048.
- Harabak M. E., Chan C., Gribskov M., Harper J., Coi J., Halford N., Kudla J., Luan S., Nimmo H., Sussman M., Thomas M., Walker-Simmons K., Zhu J. and Harmon A.** (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*; 132: 666-680.
- Hardie D. G. and Carling D.** (1998) The AMP-activated protein kinase: fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 246: 259-273.
- Hardie G. D.** (2000). Plant protein serine/threonine protein kinases: classification into sub-families and overview of function. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*; 32: 1-44.
- Hardie Graham D.** (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*; Oct; 8(10): 774-85.
- Harthill J. E., Meek S. E., Morrice N., Peggie M. W., Borch J., Wong B. and MacKintosh C.** (2006) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J* 47: 211-223.
- Hawley S. A., Davison M., Woods A., Davies S. P., Beri R. K., Carling D., and Hardie D. G.** (1996) Characterization of the AMP-activated Protein Kinase Kinase from Rat Liver and Identification of Threonine 172 as the Major Site at Which It Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase. *J Biol Chem*; 271: 27879
- Hey S., Mayerhofer H., Halford N. G. and Dickinson J. R.** (2007) DNA sequences from Arabidopsis, which encode protein kinases and function as upstream regulators of snf1 in yeast. *J Biol Chem*; 282: 10472-10479.

- Hinsiger P.** (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant soil* 237: 173-195.
- Hirsch L., Marin E., Florián M., Chiarenza S., Richard P., Nussaume L., Thibaud M. C.**(2006) Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in Arabidopsis. *Plants Biochimie* 1767-1771.
- Hudson E.R., Pan D. A., James J., Lucocq J. M., Hawley S. A., Green K. A., Baba O., Terashima T. and Hardie D. G.** (2003) A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol*; 13, 867-871.
- Hurley R. L., Barre L. K., Wood S. D., Anderson K. A., Kemp B. E., Means A. R. and Witters L. A.** (2005) Regulation of AMP-activated protein kinases by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J Biol Chem*; 281: 36662-36672.
- Jaleel M., Villa F., Deak M., Toth R., Prescott A. R., Van Aalten D. M. and Alessi D. R.** (2006). The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochem J*; 394: 545-555.
- Jiang R. and Carlson M.** (1997) The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol*; 17: 2099-2106.
- Kemp B. E.** (2004) Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *J Clin Invest*; 113: 182-184.
- Kerk D., Conley T. R., Rodriguez F. A., Tran H. T., Nimick M., Muench D. G. and Moorhead G. B. G.** (2006) A chloroplast-localized dual-specificity protein phosphatase in Arabidopsis contains a phylogenetically dispersed and ancient carbohydrate-binding domain, which binds the polysaccharide starch. *Plant J* 46; 400-413.
- Kleinow T, Bhalerao R., Breuer F., Umeda M., Salchert K., Koncz C.** (2000) Functional identification of an Arabidopsis Snf4 ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of Snf4 deficiency in yeast. *Plant J*; 23: 115-122.
- Laemmli U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of actinomyosin T4. *Nature*; 227: 680-685.
- Laurie S., McKibbin R. S. and Halford N. G.** (2003) Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an alpha-amylase (Alpha-Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *J Exp Bot*; 54: 739-747.

- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., and Herrera-Estrella L.** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Op Plant Biol.* 6: 1-8
- Lumbreras V, Alba M, Klinow T, Koncz C, Pagès M** (2001) Domain fusion between SNF-1 related kinase subunits during plant evolution. *EMBRO rep.*; 2 :55-60.
- Machovic M. and Janecek S.** (2006) The role of putative starch-binding domains. *FEBS Letters* 580; 6349-6356.
- Marschner H.** (1995). Mineral nutrition in higher plants. 2nd edition. *Academic Press* London, pp. 265-277.
- McKibbin R. S., Muttucumaru N., Paul M. J., Stephen P., Powers S. J., Burrell M. M., Coates S., Purcell P. C., Tiessen A., Geigenberger P. and Halford N. G.** (2006) Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnol J* 4: 409-418.
- Mimura T.** (1995). Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant Cell Physiol* 36: 1-7.
- Minokoshi Y., Kim Y. B., Alquier T., Furukawa N., Kim Y. B., Lee A., Xue B., Mu J., Fofelle F., Ferre P., Birnbaum M. J., Stuck B. J. And Kahn B. B.**(2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428: 569-574.
- Mukatira U. T., Liu C., Varadarajan D. K. and Raghothama K.G.** (2001) Negative Regulation of phosphate starvation-induced genes. *Plant Physiol*; 127: 1854-1862.
- Nielsen J. N., Mustard K. J., Graham D. A., Yu H., MacDonald C. S., Pilegaard H., Goodyear L. J., Hardie D. G., Richter E. A., and Wojtaszewski J. F.** 2003 .5'-AMP-activated protein kinase activity and subunit expression in exercise-trained human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 94: 631-641.
- Polekhia G., Gupta A., Michel B. J., van Denderen B., Murthy S., Feil C. S., Jennings I. G., Campbell D. J., Witters L. A., and Parker M. W., Kemp B. E. and Stapleton D.** (2003) AMPK β subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Structure* 13: 867-871.
- Polekhina G., Feil S. C., O'Donnell P., Stapleton D. and Parker W.** (2005a) Crystallization of the glycogen-binding domain of the AMP-activated protein kinase β subunit and preliminary X-ray analysis. *Acta Cryst F*61: 39-42

- Polekhia G., Gupta A., van Denderen B. J. W., Feil C. S., Kemp B. E., Stapleton D. and Parker M. W.** (2005b) Structural Basis for Glycogen Recognition by AMP-Activated Protein Kinase. *Structure* 13: 1453-1462
- Polge C. and Thomas M.** (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci*; 12: 20-28.
- Purcell P. C., Smith A. N. and Halford N. G.** (1998) Antisense expression of sucrose-non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant J*; 14, 195-202.
- Radchuk R., Radchuk V., Weschke W., Borisjuk L. and Weber H.** (2006) Repressing the Expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE gene in Pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol*; 140: 263-278.
- Raghothama K. G.** (1999) Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 665-693.
- Ramírez M, Graham M. A, Blanco-López L, Silvente S, Medrano-Soto A, Blair M, Hernández G, Vance C. P. and M Lara.** (2005) Sequencing and Analysis of Common Bean ESTs. Building a Foundation for Functional Genomics. *Plant Physiol*; 137: 1211-1227
- Rutter G. A., da Silva Xavier G. and Leclerc I.** Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J* 375: 1-16.
- Ryan P. R., Delhaize E. and Jones D. L.** (2001) Function and mechanism of organic anion exudation from plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 527-560.
- Sanders M. J., Grondin P. O., Hegarty B. D., Snowden, M. A. and Carling D.** (2007) Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-Activated protein kinase cascade. *Biochem J*; 403:139-148.
- Salt I., Celler J.W., Hawley S.A., Prescott A., Woods A., Carling D. and Hardie D.G.** (1998) AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complex containing the alpha2 isoform. *Biochem J*; 334 (Pt1): 177-187.
- Schachtman D. P., Reid R. J., Ayling S. M.** (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* 116: 447-453.

Scott, J. W. (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest*; 113: 274-284.

Shen W. and Hanley-Bowdoin L. (2006) Geminivirus infection up-regulates the expression of two Arabidopsis protein kinases related to yeast SNF1- and mammalian AMPK-Activating kinases. *Plant Physiol* 142: 1642-1655.

Singer M. and Munns D. (1991) Soils an Introduction, 2nd edition, *Mc Graw Hill*. U. S. A. pp. 200-223.

Slocombe S.P. (2002) Identification of SnIP1, a novel protein that interacts with SNF1-related protein kinase (SnRK1). *Plant Mol Biol*; 49: 31-44.

Sudgen C., Donaghy P., Halford N. G. and Hardie G. (1999) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol* 120: 257-274.

Thelander M., Oisson T. and Ronne H. (2004) Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *EMBO J* 23: 1900-1910.

Theodorou M. E. Cornel F. A., Duff S. M. and Plaxton W. C. (1992) Phosphate starvation-inducible synthesis of the alpha-subunit of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in black mustard suspension cells. *Journal of Biological Chemistry* 267: 21901-21905.

Tiessen A., Prescha, K., Branscheid A., Palacios N., McKibbin R., Halfors N. G. and Geigenberger P. (2003) Evidence that SNF1 related kinase and hexosinase are involved separate sugar signalling pathways modulating posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J*; 35: 490-500.

Vance C. P., Uhde-Stone C. and Allan D. L. (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157: 423-447.

Vincent O., Townley R., Kuchin S. and Carlson M. (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and novel glucosa signaling mechanism. *Genes Dev*; 15: 1104-1114.

Williamson L. C., Ribrioux S. P. C. P., Fitter A. H. and Leyser O. (2001) Phosphate Availability Regulates Root System Architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol* 126: 875-882.

Wilson W. A., Hawley S. A. and Hardie, D. G. (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol* 6: 1426-1434.

Woods A., Salt, I., Scout J., Hardie D.G. and Carling D. (1996) The alpha1 and alpha2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. *FEBS Lett*; 397: 347-351.

Woods A., Johnstone S. R., Dickerson K., Leiper F. C., Fryer L. G., Neumann D., Schlattner U., Wallimann T., Carlson M. and Carling D. (2003) LKB1 is the upstream in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol*; 13: 2004-2008.

Wu Ping., Ma Ligeng, Hou Xingliang, Wang Mingyi, Wu Yungrong, Liu Feiyan and Deng W. Xing (2003) Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in Arabidopsis root and leaves. *Plant Physiol* 132: 1260-1271.

Yamauchi T., Kamon J., Minokoshi Y., Ito Y., Waki H., Uchida S., Yamashita S., Noda M., Kita S., Ueki K., Eto K., Akanuma Y., Froguel P., Foufelle F., Ferre P., Carling D., Kimura S., Nagai R., Kahn B. B. and Kadowaki T. (2002) Adipopectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295.

Zhang Y., Shewry P. R., Jones H., Barcelo P., Lazzeri P. A. and Halford N. G. (2001) Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *Plant J*; 28: 431-441.

Zou M. H., Krikpatrick S. S., Davis B. J. Nelson J. S., Wiles W. G., Shalattene U., Neumann D., Brownlee M., Freeman M. B. And Goldman M. H. (2004) Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 279: 43940-43951.