



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD CATALÍTICA AKIN11 DEL
COMPLEJO ENZIMÁTICO SnRK1 DE *Arabidopsis thaliana*
DURANTE LA DEFICIENCIA DE FOSFATO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A

ESPÍNDOLA SERNA LAURA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO



MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado:

Presidente: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

Vocal: Dra. María Imelda López Villaseñor

Secretario: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Suplente: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Suplente: Dr. León Patricio Martínez Castilla

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 105 del Conjunto E del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Sustentante:

Ing. Biot. Laura Espíndola Serna

RECONOCIMIENTOS

Laura Espíndola Serna, recibió beca de CONACYT (208374).

Este proyecto ha sido financiado por PAPIIT (IN202206), PAIP (6290-13) y CONACYT (52072).

A la inigualable asesoría y ayuda de la Dra. Martha Patricia Coello Coutiño, durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Martha Patricia Coello Coutiño, la Dra. María Imelda López Villaseñor y la Dra. Tzevetanka Dimitrova Dinkova por todas sus recomendaciones y sugerencias brindadas bajo su tutoría.

Al apoyo técnico y enseñanza de la M. en C. Carmen Parra González durante todo este tiempo.

A la M. en C. María Teresa de Jesús Olivera Flores por su enseñanza y gran motivación en el trabajo de laboratorio con plantas y cultivo de tejidos vegetales.

Al Dr. Martín Vargas por sus apoyo incondicional durante el desarrollo del proyecto.

A C. Leticia García y Adelina González por su eficiente ayuda con los trámites relacionados con el posgrado.

Al Biol. Gabriel Orozco Hoyuela por su ayuda técnica en la obtención de las fotografías por microscopía confocal.

Al jurado asignado, por la amable revisión y acertados comentarios realizados al presente trabajo.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

α	Subunidad catalítica de la familia SNF1/SnRK1/AMPK
γ	Subunidad regulatoria de la familia SNF1/SnRK1/AMPK
β	Subunidad de anclaje y direccional de la familia SNF1/SnRK1/AMPK
λ	Longitud de onda
$\beta\gamma$	Subunidad atípica regulatoria, beta-gamma, de la familia SnRK1
^{32}P	Fósforo 32
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AFLP	Polimorfismos amplificados de la longitud del fragmento
AGPasa	ADP-glucosa pirofosforilasa
AIS	Secuencia autoinhibitoria de las subunidades α
AMARA	Péptido sintético, sustrato de la familia SNF1/SnRK1/AMPK
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASC	Dominio de asociación con el complejo SNF1
ATP-PFK	Fosfofructocinasa dependiente de ATP
Bas	Aminoácido de cadena lateral básica
C4	Plantas que utilizan la vía de cuatro carbonos
CAM	Metabolismo ácido de las crassulaceas
CBS	Motivo cistation β sintasa
CDPK-SnRK1	Superfamilia de cinasas: calcium-dependent protein kinase- SNF1 related kinases
cpm	Cuentas por minuto
CVM	Virus del mosaico de la coliflor
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitól
E2	Enzima ubiquitina conjugasa

EGTA	Etilen glicol del ácido tetraacético
GBD	Dominio de unión al glucógeno
GFP	Proteína Verde Fluorescente
Hid	Aminoácido con cadena lateral hidrofóbica
HMGCoA	3-hydroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa
IgG	Inmunoglobulina G
KIS	Dominio de asociación con la subunidad catalítica
miR	Micro RNA
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina
P	Fósforo
PAGE-SDS	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida desnaturizante por SDS
PBS	Buffer de fosfato salino
PBST	Buffer de fosfato salino con Tween
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PHR1	Factor de transcripción de respuesta a la deficiencia de fosfato 1
Pi	Fosfato inorgánico, ortofosfato o fosfato
pKa	Logaritmo negativo de la constante de acidez
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PP2C	Proteína fosfatasa 2C
PPi	Pirofosfato
PP _i -PFK	Fosfofructocinasa dependiente de PPi
PT	Translocador de fosfato
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RT	Transcripción reversa
SAMS	Péptido sintético, sustrato de la familia SNF1/SnRK1/AMPK
SCF	Caja Skp1-cullina-F
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNF1	Proteína cinasa de levaduras no fermentadora de sacarosa
SnRK1	Cinasa relacionada con SNF1

SPS	Sacarosa fosfato sintasa
TAE	Tris-acetato, EDTA
TBP	Proteína de unión a caja TATA
TPS5	Trealosa 5 fosfato sintasa
UBA	Dominios de asociación a ubiquitina
UBC24	E2 ubiquitina conjugasa 24
UGPasa	UDP-glucosa pirofosforilasa
SUMO	Small ubiquitin-like modifier

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	3
2.1	El fósforo y su importancia en las plantas	3
2.2	Adquisición, transporte y almacenamiento de P en las plantas	3
2.3	Deficiencia de fosfato en las plantas	6
2.4	Respuestas de las plantas para sobrevivir ante la deficiencia de Pi	7
2.4.1	Alteración en la morfología de la raíz	8
2.4.2	Secreción o exudación de componentes químicos en la rizósfera	8
2.4.3	Asociación con microorganismos	8
2.4.4	Respuestas bioquímicas	9
2.4.5	Reutilización de Pi en las plantas	11
2.5	La deficiencia de fosfato y la regulación génica	12
2.6	La proteína cinasa SnRK1: clasificación	13
2.7	Estructura, similitudes y diferencias de la familia SNF1/AMPK/SnRK1	14
2.7.1	Subunidad catalítica α	15
2.7.2	Subunidad reguladora γ	16
2.7.3	Subunidad reguladora β	19
2.8	Regulación de la familia de cinasas AMPK/SNF1/SnRK1	20
2.9	Función de los complejos AMPK/SNF1/SnRK1	21
2.9.1	SNF1 es un controlador que permite adaptación a la fuente de energía	22
2.9.2	AMPK regula la demanda energética en los organismos	24
2.9.3	SnRK1 regula el metabolismo global de la planta	26
3.	HIPÓTESIS	29
4.	OBJETIVO GENERAL	30
4.1	Objetivos específicos	30
5.	METODOLOGÍA	31
5.1	Condiciones de crecimiento y tratamiento	31

5.2	RT-PCR	31
5.3	Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos	32
5.4	Transformación de <i>A. thaliana</i> por el método de infiltración	32
5.5	Selección de plantas transgénicas	33
5.6	Localización celular de la enzima AKIN11	34
5.7	Inmunodetección de la proteína de fusión AKIN11-GFP	34
	5.7.1 Extracción e Inmunoprecipitación de proteínas	34
	5.7.2 Electroforesis en Gel de poliacrilamida-SDS	35
	5.7.3 Western blot	35
5.8	Actividad cinasa	36
	5.8.1 Extracción y precipitación del complejo SnRK1	36
	5.8.2 Reacción de fosforilación del péptido SAMS	36
	5.8.3 Cuantificación de ³² P incorporado al péptido SAMS	37
6.	RESULTADOS	38
6.1	Expresión del gen <i>akin11</i> en condiciones suficientes de P I	38
6.2	Expresión del gen AKIN11 en deficiencia de fosfato	39
	6.2.1 RT-PCR	40
6.3	Producción de plantas que sobreexpresan <i>akin11</i>	41
6.4	Localización celular de la proteína AKIN11	43
6.5	Expresión de la proteína AKIN11 en deficiencia de Pi	43
	6.5.1 Localización celular de la proteína AKIN11 en condiciones deficientes de Pi	45
6.6	Determinación de la cantidad de AKIN11 por Western Blot	46
6.7	Determinación de actividad cinasa SnRK1 en plantas transgénicas	47
7.	DISCUSIÓN	49
8.	CONCLUSIONES	53
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Adquisición y transporte de Pi dentro de la planta	4
Figura 2.	Disponibilidad de Pi	7
Figura 3.	Esquema de la formación del complejo heterotrimérico AMPK/SNF1/SnRK1	14
Figura 4.	Estructura de las subunidades de las proteínas SNF1/AMPK/SnRK1	17
Figura 5.	Subunidades atípicas encontradas en plantas	18
Figura 6.	Sitios de fosforilación para SNF1, AMPK y SnRK1	22
Figura 7.	SNF1 regula la toma de fuentes alternativas de carbono a glucosa	23
Figura 8.	Regulación de la homeostasis energética por el sistema AMPK	24
Figura 9.	Procesos clave del metabolismo energético que son regulados por AMPK.	25
Figura 10.	SnRK1 es un regulador energético global de la planta	26
Figura 11.	Expresión de los genes codificantes de la subunidad catalítica SnRK1	38
Figura 12.	Plantas silvestres en deficiencia de Pi	39
Figura 13.	Diagrama del gen akin11 en donde se muestra la región amplificada del ADNc de akin11 mediante la técnica de RT.PCR	40
Figura 14.	Expresión de akin11 en deficiencia de Pi	41
Figura 15.	T-ADN del vector de clonación	42
Figura 16.	Selección de plantas transgénicas	42
Figura 17.	PCR para comprobación de transfección de Arabidopsis	43
Figura 18.	Fotografías de microscopía confocal de cortes de tejido de hoja de plantas creciendo en condiciones normales de Pi	44
Figura 19.	Plantas transgénicas en tratamiento de suficiencia y deficiencia de Pi	45
Figura 20.	AKIN11-GFP en deficiencia de Pi	45
Figura 21.	Western blot de inmunoprecipitados de proteína AKIN11-GFP provenientes de hoja de plantas transgénicas AKIN11-GFP 12	47
Figura 22.	Gráfica de la actividad cinasa debida a SnRK1 en plantas transgénicas	48

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Ejemplos de géneros microbianos benéficos que afectan la disponibilidad de P	9
----------	--	---

1. RESUMEN

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para las plantas, cumple un importante papel estructural, participa en la transducción de señales y en la regulación enzimática en respuesta a cambios metabólicos y a diversos tipos de estrés. La forma de P que es absorbido y transportado dentro de la planta es el ión ortofosfato (Pi). El Pi es el más diluido y menos móvil de todos los nutrientes en el suelo, por lo que existe una baja concentración de la forma asimilable. Cuando los niveles de Pi se encuentran en el rango micromolar, las plantas desarrollan estrategias que les permiten sobrevivir, induciendo cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares, para obtener y utilizar de manera más eficiente el Pi. Aunque los avances para explicar los cambios metabólicos que presentan las plantas ante la deficiencia de fosfato son amplios, poco se sabe acerca de las cascadas de transducción de señales que los producen.

Investigaciones realizadas en nuestro laboratorio utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana*, indican que algunas cinasas tipo SnRK1 tienen un papel importante en la regulación metabólica durante la deficiencia de Pi. SnRK1 es un complejo heterotrimérico que pertenece a la familia de proteínas SNF1/AMPK/SnRK1 altamente conservada en todos los eucariontes. Estas cinasas se estimulan en respuesta a cambios en el contenido energético celular inactivando rutas metabólicas que consumen ATP y encendiendo otras que lo producen. La SnRK1 está conformada por una subunidad catalítica llamada α y dos subunidades regulatorias β y γ ; existe otra subunidad regulatoria atípica llamada $\beta\gamma$ en plantas, que se compone de la unión del dominio N-terminal de la subunidad β y el dominio C-terminal de la subunidad γ . En *Arabidopsis thaliana* se han reportado dos tipos de subunidades α : AKIN10 y AKIN11; dos subunidades γ conocidas como AKIN γ 1 y AKIN γ 2; tres tipos de subunidad β AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β 3 y una subunidad $\beta\gamma$ denominada AtSNF4. Puesto que existe más de una proteína para cada subunidad, las combinaciones de heterotrímeros que podrían formarse son múltiples y se especula que cada una podría realizar funciones específicas en determinado momento del desarrollo de la planta.

En este trabajo observamos el efecto que tiene la deficiencia de Pi sobre la subunidad catalítica AKIN11 tanto a nivel de transcrito como de proteína. Mediante la técnica de RT-PCR no encontramos variaciones en los niveles del mensaje de *akin11* en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* que crecieron en deficiencia de Pi, respecto a las plantas crecidas en suficiencia de Pi. Para estudiar a la proteína generamos plantas transgénicas con AKIN11 fusionada hacia su extremo carboxilo terminal con GFP. El análisis con microscopía confocal indicó que la localización subcelular de AKIN11 es principalmente cloroplástica. En plantas transgénicas crecidas en deficiencia de Pi, la fluorescencia de la GFP desaparece casi completamente. Western blots de extractos de hojas de plantas transgénicas utilizando anticuerpos anti-GFP, indicaron que existe una reducción muy importante en la cantidad de proteína, lo cual coincidió con los ensayos de la actividad de la SnRK1, en donde la actividad disminuye en las plantas transgénicas que han sido expuestas a deficiencia de Pi. Estos datos sugieren que la subunidad catalítica AKIN11 se regula negativamente en condiciones de deficiencia de Pi.

2. INTRODUCCIÓN

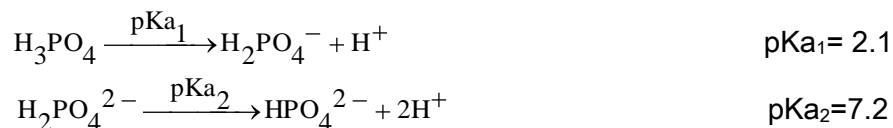
2.1 El fósforo y su importancia en las plantas

Las plantas como organismos multicelulares autótrofos requieren además de luz, agua y CO₂ de una gran variedad de sustancias químicas denominadas nutrientes que toman del exterior para realizar su metabolismo y funciones vitales. Estos nutrientes se pueden clasificar como macro y micronutrientes.

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para las plantas y cumple funciones muy diversas e importantes. Es un componente estructural de nucleótidos trifosfato, ácidos nucleicos y fosfolípidos. Actúa como regulador de rutas de señalización y transducción de señales por fosforilación y desfosforilación de enzimas (Raghothama y Karthikeyan, 2005), es indispensable para el acoplamiento de las reacciones de luz y oscuridad en la fotosíntesis, asimilación de carbono y respiración; además está vinculado con el transporte de azúcares fosforilados a través de la membrana, síntesis de almidón y diversos procesos que regulan el crecimiento y desarrollo de la planta (Karthikeyan et al., 2007).

2.2 Adquisición, transporte y almacenamiento de P en las plantas

El fósforo ingresa a la planta a través de sus raíces como Pi, ya sea en forma de anión monovalente H₂PO₄⁻ o divalente HPO₄²⁻, dependiendo de la naturaleza básica o ácida del suelo. Se conoce que la velocidad de toma de Pi es mayor cuando el pH del medio se encuentra en el rango de 5.0 y 6.0, de acuerdo a los pKas de disociación de los aniones Pi, la forma prevaleciente a este pH es H₂PO₄⁻ (Schachtman et al., 1998; Raghothama, 2000).



En las membranas plasmáticas de las células de las raíces se localizan transportadores específicos que permiten la entrada de Pi al interior de las células (figura 1). Pht1;1 y Pht1;4 son dos transportadores de alta afinidad en Arabidopsis, que contribuyen mayoritariamente al

transporte de Pi al interior de la planta, tanto en condiciones normales como deficientes de Pi (Shin et al., 2004).

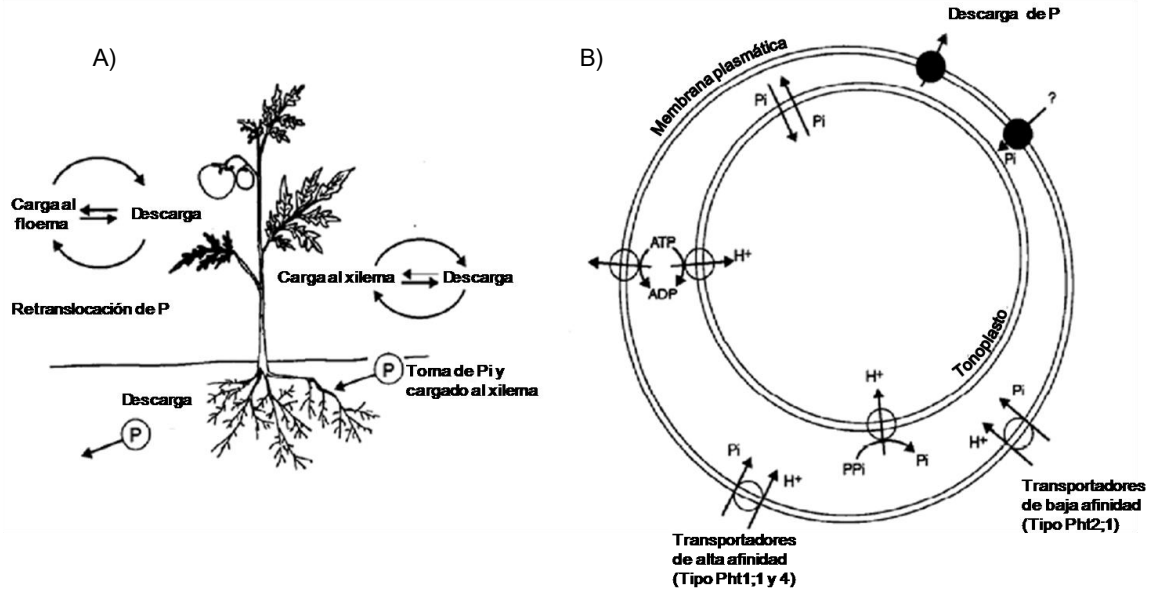


Figura 1. Adquisición y transporte de Pi dentro de la planta. A) Las plantas toman el Pi por las raíces, a través de transportadores de alta afinidad, posteriormente, es cargado al xilema para su transporte hasta su sitio blanco; diferentes sistemas de translocadores y transportadores están involucrados en el proceso. Dentro de la planta también existe recambio de Pi entre diversos tejidos, el Pi es transportado principalmente por el floema. Cuando los niveles de Pi son altos sistemas de canales iónicos permiten la descarga de Pi al exterior. B) esquema de diversos transportadores de alta y baja afinidad, así como translocadores de Pi permiten el transporte y almacenamiento de Pi, La fuerza que permite el movimiento de Pi hacia y dentro de la planta está dado por bombas de protones situadas en la membrana plasmática y dentro del tonoplasto por pirofosfatasas y bombas de protones (adaptado de Raghothama, 2000).

Debido a las altas concentraciones de Pi requeridas en el citoplasma de las células (5-10 mM) comparada con la existente en la rizosfera (1-10 μM en la mayoría de suelos de cultivo), el Pi es transportado en contra de un gradiente de concentración. Su movimiento está acoplado al simporte con protones (de 2 a 4 $\text{H}^+/\text{H}_2\text{PO}_4^-$) hacia el interior del citoplasma y el tonoplasto, mediante gasto de ATP por las bombas de protones (figura 1), localizadas en ambos compartimientos celulares (Schachtman et al., 1998; Ticconi y Abel, 2004).

La mayor parte del Pi adquirido por la raíz pasa al xilema (tejido que además de agua transporta sales minerales), de este modo, el Pi se impulsa hacia la parte aérea de la planta, donde es descargado en los tejidos fotosintéticos. Una proteína muy importante en la carga de fosfato al xilema de las raíces es la llamada PHO1, las plantas mutantes en el gen *pho1* tienen una considerable reducción de Pi en sus hojas y presentan síntomas de deficiencia de P, que incluyen una disminución del crecimiento de la parte aérea de la planta con tallos delgados, hojas pequeñas y pocas inflorescencias, y, acumulación de antocianinas en hojas y tallos. No existe diferencia en el contenido de Pi en las raíces de plantas mutantes *pho1* y silvestres (Poirier et al., 1991). El genoma de *Arabidopsis* contiene 11 miembros de la familia de genes *pho1*. La función precisa de las proteínas PHO1 permanece sin ser elucidada, pero los patrones de expresión de los homólogos *pho1*, indican un probable papel en el importe y exporte de Pi, tanto en la transferencia de Pi al xilema de varios órganos, como en la adquisición de Pi en las células, tales como polen o células epidérmicas y corticales de la raíz (Wuang et al., 2004).

Cuando el Pi ha llegado a su destino puede ser ocupado para el metabolismo, desarrollo y crecimiento de las plantas, transportado a diferentes compartimientos celulares o almacenado para su posterior uso principalmente en la vacuola. Se han identificado algunos transportadores involucrados en la movilización de Pi hacia el interior de las células y entre diferentes organelos de las plantas, los cuales se han clasificado en cuatro familias: PHT1 lleva a cabo la toma de Pi a través de la membrana plasmática, a éstos pertenecen Pht1;1 al Pht1;9 (Shin et al., 2004). La familia PHT2 se encuentra esencialmente en la membrana interna de los plastidios, uno de sus miembros es Pht2;1 se expresa principalmente en tejidos verdes y es considerado un transportador de baja afinidad, está implicado en la deslocalización de Pi entre la parte aérea y raíz y en la translocación de Pi dentro de la hoja (Versaw y Harrison, 2002). PHT3 son transportadores de Pi que se localizan en la membrana interna mitocondrial (Poirier y Bucher, 2002). La familia PHT4 está involucrada en el transporte de Pi entre el citosol y el cloroplasto, plastidios heterotróficos (no fotosintéticos) y el aparato de Golgi (Guo et al., 2008). También existe una familia de translocadores específicos de Pi (PT) involucrados en procesos de transporte de intermediarios fotosintéticos, tales como las triosas fosfato, fosfoenolpiruvato, glucosa 6 fosfato y xilulosa en intercambio con Pi inorgánico (Poirier y Bucher, 2002). En la

vacuola el Pi puede entrar o salir a través de su membrana (tonoplasto), dependiendo de la concentración citoplásmica o requerimientos nutrimentales de Pi en la célula vegetal, sin embargo, a la fecha no se ha descrito algún transportador de Pi específico para este organelo (Ticconi y Abel, 2004).

En la parte aérea de la planta el movimiento de Pi de tejidos senescentes a jóvenes y del tallo hacia la raíz se lleva a cabo a través del floema y este movimiento se incrementa cuando los niveles de Pi son bajos.

Si la concentración de Pi no es limitante, la planta debe eliminar el Pi que no necesita para evitar su toxicidad, esto lo realiza mediante canales iónicos de Pi que se encuentran en la membrana plasmática de la raíz. De este modo, el movimiento a través del tonoplasto, junto con la toma y eflujo de Pi regula la homeostasis celular de Pi (Raghotama, 2000).

2.3 Deficiencia de fosfato en las plantas

Aunque el P es abundante en la rizósfera, las propiedades fisicoquímicas del suelo y la química del Pi hacen de éste uno de los nutrientes menos disponibles para la planta. Después del nitrógeno, es el segundo macronutriente que más limita el crecimiento de la planta. El Pi se combina fácilmente con la materia orgánica e inorgánica presente en el suelo, formando sustancias que no son disponibles para la planta (Poirier y Bucher, 2002; Ticconi y Abel, 2004). Es sobresaliente que cerca del 20 al 80% de P en los suelos se encuentra como formas orgánicas, del cual el ácido fítico (inositol hexafosfato) es el principal componente. El resto del P se puede encontrar como la fracción inorgánica consistente de 170 formas minerales de las cuales los compuestos que destacan son el fosfato de calcio (apatita) y los óxidos asociados a aluminio (Al) y hierro (Fe) (Holford, 1997). De todos los macronutrientes en el suelo, el Pi es el más diluido y su concentración difícilmente alcanza valores de 10 μM y puede llegar a disminuir a concentraciones submicromolares en la interfaz suelo/raíz. Además de que el Pi se mueve por difusión a velocidades muy bajas (10^{-12} a 10^{-15} $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$), las plantas crean a menudo una zona de agotamiento de Pi alrededor de la raíz (Schachtman et al., 1998; Rengel y Marschner, 2005), por lo que se dice que están en constante deficiencia de Pi (ver figura 2). En este sentido, la

deficiencia de Pi es considerada una de las principales limitaciones para producción de cosechas principalmente en países tropicales (Raghothama y Karthikeyan, 2005).

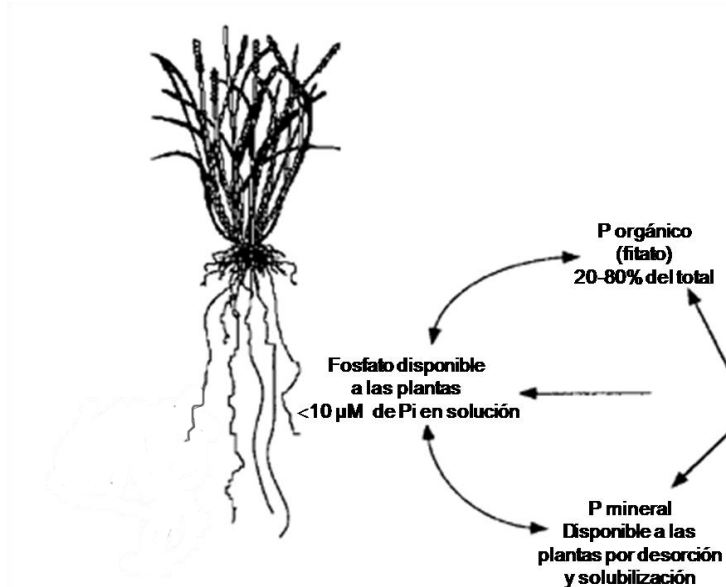


Figura 2. Disponibilidad de Pi. La principal forma de asimilación de P por la planta es el Pi, el cual puede llegar a concentraciones menores a $10 \mu\text{M}$. Debido a esto en las raíces puede existir una zona de agotamiento de Pi en la interfaz suelo-raíz, por lo que las plantas se encontrarían en constante deficiencia de Pi (tomado de Schachtman et al., 1998).

Para superar los problemas de disponibilidad de Pi, las plantas han desarrollado una serie de respuestas adaptativas tanto morfológicas, bioquímicas como moleculares que hacen más eficiente el uso interno de Pi y maximizan la adquisición externa de Pi; se ha sugerido que algunas de éstas, ayudan a mineralizar y solubilizar el P del suelo, aumentando los niveles de Pi (Coello, 2002).

2.4 Respuestas de las plantas para sobrevivir ante la deficiencia de Pi

Los mecanismos de respuesta por los que la planta se adapta a la disponibilidad de nutrientes son la adquisición eficiente es decir, la capacidad para tomar un nutriente del suelo que tiene baja disponibilidad y la utilización eficiente que es la capacidad para producir una gran cantidad de materia orgánica por unidad de nutriente tomado (Rengel y Marschner, 2005).

En el caso de la adquisición eficiente, los cambios desarrollados en la planta se pueden dividir en tres categorías:

- Alteración de la geometría o arquitectura de la raíz.
- Secreción o exudación de componentes químicos hacia la rizósfera.
- Asociación con microorganismos.

2.4.1 Alteración en la morfología de la raíz

Las plantas creciendo en suelos deficientes de Pi alteran la arquitectura de su raíz, detienen el crecimiento de su raíz primaria, presentan un aumento en el número y longitud de raíces secundarias y aumento en la longitud y densidad de pelos radiculares. Estas modificaciones permiten la exploración de un gran volumen de suelo por el sistema de raíces para la adquisición de Pi, debido, a que la superficie de contacto suelo-raíz se incrementa. Los pelos radiculares contribuyen significativamente a la superficie de la raíz (arriba del 80%) y son el sitio primario de toma de Pi en especies como Arabidopsis que no forman asociaciones micorrízicas (Jungk, 2001; López-Bucio et al., 2002; Sánchez-Calderón et al., 2006).

2.4.2 Secreción o exudación de componentes químicos en la rizósfera

La exudación de ácidos orgánicos, fosfatasas ácidas y nucleasas para solubilizar o liberar Pi de fuentes orgánicas en el suelo, son algunas de las estrategias que más utiliza la planta para adaptarse a una deficiencia de Pi (Parra et al., 2004; Sánchez-Calderón et al., 2006). La exudación de aniones de ácidos orgánicos tiene dos finalidades; por un lado acidifica el suelo, liberando el Pi de algunos complejos de P (Hinsinger, 2001) y, por otro, sirve como fuente de carbono para microorganismos benéficos que ayudan a incrementar la disponibilidad de Pi por la secreción de fosfatasas, fitasas y cambios en el pH (ver siguiente apartado). Los carboxilatos que son típicamente exudados por la planta son citrato, malato, malonato, acetato, fumarato, succinato, lactato y oxalacetato (Rengel, 2002).

2.4.3 Asociación con microorganismos

Algunos de los microorganismos que viven en el suelo pueden formar asociaciones simbióticas con las plantas que se encuentran en deficiencia de Pi, algunos ejemplos se mencionan en la tabla1, los cuales se clasifican como solubilizadores de Pi y productores de fitasa.

Para que se dé una efectiva interacción entre solubilizadores y la planta debe de existir a) una alta población de los microorganismos y que esta sea estable en la rizosfera por periodos largos, b) la raíz, los solubilizadores o ambos deben exudar altas concentraciones de carboxilatos y protones en la rizosfera y c) por otra parte, los microorganismos y hongos micorrízicos u otros microorganismos benéficos deben tener bajos consumos de P (Rengel y Marschner, 2005).

Tabla 1. Ejemplos de géneros microbianos benéficos que afectan la disponibilidad de P. Adaptado de Rengel y Marschner (2005).

Solubilizadores de P	Productores de fitasa
<i>Bradyrhizobium, Rhizobium</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Gordonia</i>	<i>Aspergillus, Emmericella, Penicillium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Telephora, Suillus (hongo ectomicorrizico)</i>
<i>Rahella</i>	
<i>Panthoea</i>	
<i>Pseudomonas</i>	
<i>Aspergillus, Penicillium, Trichoderma</i>	

Los productores de fitasa son microorganismos que pueden secretar altas concentraciones de esa enzima la cual hidroliza el fitato que es inositol hexafosfato (también conocido como ácido fítico) y contribuyen a la acidificación del suelo y solubilizan el P.

Los mecanismos que desarrollan las plantas para la utilización eficiente de Pi ante estrés por deficiencia de este nutriente se pueden dividir en las siguientes categorías:

- Respuestas bioquímicas
- Reutilización de Pi

2.4.4 Respuestas bioquímicas

Las plantas deben adaptarse a lo largo de toda su vida a los cambios ambientales que se ejercen sobre ellas, para lo cual han desarrollado ciertas respuestas bioquímicas que les permiten ajustar su metabolismo y sobrevivir en escenarios adversos. Durante el estrés por

deficiencia de Pi los niveles de Pi citoplasmático en las células vegetales disminuyen (aproximadamente cincuenta veces) y cuando se presentan casos severos de deficiencia de Pi la concentración de ATP también se reduce considerablemente (arriba del 80%), afectándose profundamente varios aspectos del metabolismo de la planta incluyendo la fotosíntesis, la fijación de carbono, la glicólisis y la respiración (Plaxton, 2004). Para superar estos problemas, las plantas realizan pasos (reacciones enzimáticas) alternativos en las rutas bioquímicas que comúnmente llevan a cabo, lo cual les permite seguir generando energía y continuar el metabolismo de carbono para los procesos metabólicos claves. Un ejemplo lo podemos observar en el aumento en la utilización de pirofosfato inorgánico (PPi), como un donador de energía. El PPi es un subproducto de las reacciones anabólicas, que se acumula en el citoplasma de las células vegetales y que se mantiene en una concentración aproximadamente constante de 0.5 mM, debido a que su hidrólisis es baja (Stitt, 1998). Aún en condiciones estresantes, tales como la anoxia o la deficiencia de Pi, el PPi se produce a bajas velocidades durante la síntesis de macromoléculas esenciales (por ejemplo proteínas, ácidos nucleicos, membranas, etc.), necesarias para soportar un crecimiento disminuido o para reemplazar aquellas que pueden iniciar a dañarse. Las plantas tienen enzimas que utilizan el PPi para incrementar la eficiencia energética de diversos procesos celulares (Plaxton, 2006).

A nivel de glicólisis existen enzimas alternativas de esta ruta metabólica que utilizan PPi y que son independientes de adenilatos o Pi, las cuales facilitan el flujo catabólico para la obtención de energía y piruvato durante estrés severo por Pi cuando los niveles de ATP y Pi son muy bajos, estas enzimas son:

- Sacarosa sintasa dependiente de PPi, que convierte la sacarosa a hexosas fosfato como vía alterna a la ruta de la invertasa dependiente de ATP.
- Fosfofructocinasa dependiente de PPi (**PP_i-PFK** “PP_i-dependent phosphofructokinase”) que convierte la fructuosa 6 fosfato a fructuosa 1, 6 bisfosfato en una reacción altamente reversible. Se ha propuesto que la deficiencia de Pi promueve la actividad de la enzima *in vivo*, mientras se inhibe la actividad de ATP-fosfofructocinasa (ATP-PFK).
- NADP⁺-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante, que sustituye a la NAD⁺-gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa fosforilante.

- PEP carboxilasa que cataliza la fijación inicial de CO₂ atmosférico en hojas con metabolismo CAM y C₄. Durante la deficiencia de Pi, junto con las enzimas malato deshidrogenasa citosólica y la enzima málica mitocondrial dependiente de NAD⁺, la PEP carboxilasa puede sintetizar al menos teóricamente fosfoenolpiruvato de manera alternativa a la piruvato cinasa (Plaxton, 2004).

Otro ajuste metabólico observado en la deficiencia de Pi es la sobreexpresión de enzimas para la liberación y reutilización de Pi. Tal es el caso de la UGPasa (UDP-glucosa pirofosforilasa), sacarosa fosfato sintasa (SPS) y fructuosa 1, 6 bisfosfatasa (Ciereszko et al., 2001; Ciereszko et al., 2005; Müller et al., 2007) enzimas del citoplasma y claves durante la síntesis de sacarosa que dan como subproducto Pi.

Es común en Arabidopsis, como en otras plantas sometidas a deficiencia de Pi un incremento considerable en la cantidad de almidón en tejidos fotosintéticos, respuesta mediada tanto por la desinhibición e incremento en la expresión de genes de enzimas biosintéticas implicadas en esta vía, tal como la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), así como una reducción en la movilización del almidón durante la noche (Ciereszko et al., 2001; Bernal et al., 2005). También, se reduce el intercambio de triosas fosfato derivadas de la fotosíntesis por Pi a través de la envoltura cloroplástica. Así, un efecto en la conversión de triosa fosfato a almidón es la liberación de Pi dentro del cloroplasto que puede ser utilizado para mantener la fotosíntesis (Rao y Terry, 1995).

2.4.5 Reutilización de Pi en las plantas

La recirculación y reutilización del fosfato interno, que ha sido almacenado, es otra alternativa que usan las plantas deficientes de Pi para mantener su homeostasis. Se conoce por estudios de RMN de ³²P que las plantas distribuyen mayoritariamente el Pi entre el citoplasma (metabolismo) y las pozas vacuolares (almacenamiento). El Pi se mantiene esencialmente constante a expensas de grandes fluctuaciones de Pi vacuolar; sin embargo, si se prolonga la deficiencia de Pi el contenido vacuolar disminuirá, y, por tanto, habrá reducciones del Pi citoplasmático (Plaxton, 2004). Para poder sobrevivir, la planta también es capaz de movilizar el P que está almacenado en distintas biomoléculas tales como ácidos nucleicos y fosfolípidos.

Los fosfolípidos constituyen una de las pozas más grandes de Pi en la planta, durante la deficiencia de Pi, se induce su sustitución en las membranas plasmáticas por otros que no contengan Pi como grupo polar tales como sulfolípidos y galactolípidos; en mitocondrias y cloroplastos también disminuye el contenido de fosfolípidos (revisado por Dörmann y Benning, 2002; Andersson et al., 2003; Jouhet et al., 2004; Kobayashi et al., 2006). Otro mecanismo que desarrolla la planta es el reciclaje de Pi por su movilización desde los tejidos senescentes a los jóvenes mediante su transporte por el floema.

2.5 La deficiencia de fosfato y la regulación génica

Las respuestas de las plantas ante la deficiencia de fosfato están relacionadas ya sea directa o indirectamente con cambios en la expresión de genes, es decir, que la deficiencia de Pi puede considerarse como una señal que estimula el aumento o disminución de la expresión génica específica, lo cual permite a la planta mantener la homeostasis de Pi en su interior y adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Los genes que responden a la deficiencia de fosfato incluyen aquellos involucrados en la biogénesis celular, la organización celular, los mecanismos de transporte celular, la división celular, el metabolismo de los ácidos nucleicos, el metabolismo de los aminoácidos, la síntesis proteica, el transporte de proteínas, el metabolismo del carbono, la fotosíntesis, la respiración, la respiración foto-oxidativa, el metabolismo del nitrógeno, fósforo y azufre, la senescencia, el transporte facilitado, la transducción de señales, la compartimentalización, la transcripción, el metabolismo secundario, la regulación del desarrollo, la respuestas a estrés y otros (Wu et al., 2003).

Existe una amplia lista de genes individuales que se han identificado y descrito como de respuesta específica a la deficiencia de Pi, donde se incluyen las fosfatasas ácidas, las RNAsas, las fosfodiesterasas, la β -glucosidasa, los transportadores de Pi, así como el gen *pho1* (Raghothama, 2000; Hamburger et al., 2002).

Sólo un factor de transcripción MYB llamado PHR1 (**phosphate starvation response1**) ha sido caracterizado como un regulador de un grupo específico de genes de respuesta a deficiencia de Pi tales como *AtACP5*, *AtIPS1/3*, *At4*, y *RNS1*, los cuales son activados por la deficiencia de Pi, a través de un elemento cis GNATATNC (Rubio et al., 2001; Franco-Zorrilla et al., 2004).

Mediante microarreglos, Müller y col. (2007) encontraron 11 posibles factores de transcripción en *Arabidopsis thaliana* que actúan en deficiencia de Pi.

Estudios en la expresión global de genes en plantas de *Arabidopsis* indican que la respuesta a la deficiencia de Pi es específica (Wu et al., 2003), es decir, mientras algunos genes como los transportadores de alta afinidad aumentan sus niveles de transcrito en las raíces de las plantas, su expresión se ve disminuida en la roseta. Sin embargo, a pesar de los avances en la comprensión de la respuesta a la deficiencia de Pi, poco se conoce acerca de los componentes moleculares de las rutas de transducción de señales que dirigen estos procesos (Wu et al., 2003; Misson et al., 2005; Müller et al., 2007).

En nuestro laboratorio, se han identificado genes que codifican para proteínas implicadas en vías de transducción de señales, durante la deficiencia de Pi, en plantas de frijol. Uno de ellos es un regulador de respuesta tipo A denominado PvRR1, que se aisló de una biblioteca de ADNc de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), crecidas bajo condiciones de deficiencia de Pi. PvRR1 está involucrado principalmente en la transducción de señales de citocinas y tiene localización nuclear. Durante la deficiencia de Pi, PvRR1 incrementó sus niveles de transcrito, y, regreso a su nivel basal, cuando se volvió a suplementar Pi al medio (Camacho et al., 2008). También se identificó un gen mediante la técnica de AFLP, que se expresó durante la deficiencia de Pi, pero no en condiciones normales, en raíces de frijol (Coello, datos no publicados). Este gen, presentó alto grado de similitud en su secuencia, con la subunidad catalítica de un complejo proteico con actividad de cinasa, denominado AMPK (**AMP-activated kinase**) en animales y SNF1 (**Sucrose Non Fermenting**) de levaduras. En plantas, el ortólogo de estas cinasas, se conoce como SnRK1 (**SNF1 Related Kinase**).

2.6 La proteína cinasa SnRK1: clasificación

Las cinasas están involucradas en aspectos claves de la función celular, incluyendo la división celular, el metabolismo y la respuesta a señales externas. En *Arabidopsis*, se estima que 4% de su genoma codifica para enzimas tipo cinasas; un grupo de ellas contiene un dominio catalítico típico de cinasas eucariontes Ser/Thr lo cual permitió englobarlas dentro de una superfamilia

llamada CDPK-SnRK1, a la cual pertenecen las SnRKs (SNF1 related kinases; Hrabak et al., 2003).

Las proteínas SnRK de *A. thaliana* se dividen en tres subgrupos llamados SnRK1, SnRK2 y SnRK3.

Las SnRK1 junto con sus ortólogos SNF1 y AMPK1, en levaduras y animales, respectivamente, forman la familia SNF1/AMPK/SnRK1, enzimas altamente conservadas en todos los eucariontes, cuya función es elemental en el control del balance energético (Hardie et al., 1998). En respuesta a ciertos estímulos son considerados elementos de regulación y actúan como transductores en las cascadas de señalización, que permiten la adaptación y sobrevivencia de los organismos (Hardie et al., 2006; Polge y Thomas, 2007).

Los otros subgrupos de las SnRK, SnRK2 y SnRK3 parecen ser cinasas exclusivas de plantas, muestran 42-45% de identidad de secuencia de aminoácidos, en sus dominios catalíticos con SnRK1, AMPK y SNF1. En comparación con SnRK1, no complementan a la mutante de levadura $\Delta snf1$ (Hrabak et al., 2003) y se ha sugerido que tienen diferentes sustratos (Halford et al., 2004). SnRK2 está relacionado con cambios en la expresión de genes inducidos por ácido abscísico (revisado por Halford et al., 2003). La familia SnRK3 incluye a una cinasa SOS2 involucrada en la resistencia a sal (Liu et al., 2000).

2.7 Estructura, similitudes y diferencias de la familia SNF1/AMPK/SnRK1

Los miembros de la familia cinasa SNF1/AMPK/SnRK1 forman un complejo heterotrimérico que consta de una subunidad catalítica α y dos subunidades regulatorias β y γ (Figura 3).

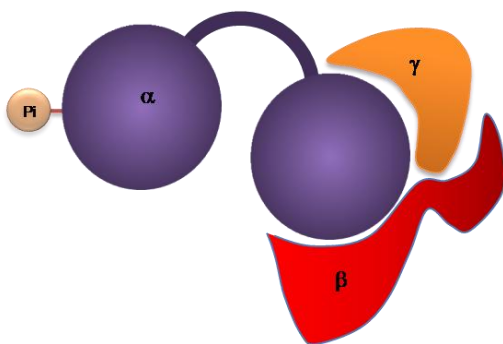


Figura 3. Esquema de la formación del complejo heterotrimérico AMPK/SNF1/SnRK1. Las cinasas de la familia SNF1 se forman por una subunidad catalítica α , y dos regulatorias β y γ (tomado de Polge C y Thomas M, 2007).

La notable similitud estructural entre los complejos de las plantas, levaduras y animales sugiere la existencia de una función ancestral común en la regulación de energía y metabolismo del carbono. (Halford et al., 2003). A continuación, detallaremos algunos de los aspectos de la estructura que definen la función de cada una de las subunidades de las cinasas SNF1/AMPK/SnRK1.

2.7.1 Subunidad catalítica α

Las subunidades α de la familia de cinasas SNF1/AMPK/SnRK1 muestran 48% de identidad entre los diferentes reinos (levaduras, animales y plantas) pero si nos enfocamos sólo a los dominios catalíticos el porcentaje de identidad alcanza 60-65% (Halford et al., 2000). El dominio catalítico de las subunidades α es de tipo Ser/Tre, tiene una longitud de aproximadamente 300 aminoácidos, los cuales forman una asa (loop) de activación hacia la mitad del extremo amino terminal con un residuo de Thr (T210 en SNF1 de levadura, T172 en AMPK α de animales y T175 en AKIN10 y AKIN11 de Arabidopsis) el cual debe fosforilarse para mantener la forma activa de la enzima (Hardie et al., 1998; Hardie, 2007b; Baena-González et al., 2007). La presencia y secuencia del dominio catalítico es una de las características que distingue a la familia de proteínas SNF1/AMPK/SnRK1 de otras familias de cinasas (Halford et al., 2003).

Dentro de la estructura de la subunidad α (figura 4) se encuentra una región adyacente al extremo carboxilo del dominio catalítico que actúa como una secuencia autoinhibitoria (AIS del inglés *autoinhibitory sequence*) y reprime la actividad cinasa. El dominio AIS muestra una secuencia similar con los dominios de asociación a ubiquitina (UBA *ubiquitin-associated domain*) (Hardie, 2007b). La región carboxilo terminal de la subunidad α es requerido para formación del complejo con las subunidades β y γ (Crute et al., 1998).

En levaduras, la subunidad catalítica se denomina SNF1 y es codificada por un solo gen, el *snf1*. En comparación, en animales se conocen dos diferentes isoformas de la subunidad α conocidas como $\alpha 1$ o $\alpha 2$ codificadas por los genes PRKAA1 y PRKAA2, respectivamente (Hardie y Sakamoto, 2006). También, se han encontrado subunidades α en plantas. El primer gen SnRK1 fue clonado en 1991 por Alderson y desde entonces se han encontrado homólogos en muchas especies vegetales (Halford y Hardie, 1998). En *Arabidopsis thaliana* existen tres

genes codificantes de subunidades α *akin10*, *akin11* y *akin12*, de los cuales sólo los dos primeros se transcriben (Hrabak et al., 2003; Fragoso et al., 2009).

2.7.2 Subunidad regulatoria γ

La subunidad regulatoria γ está implicada en el mantenimiento de la conformación activa de los complejos heterotriméricos SNF1, por su unión al dominio AIS de la subunidad α . El nivel de conservación entre las subunidades γ de levaduras, animales y plantas varía del 20 a 35% (Kemp et al., 2003).

Sólo existe una subunidad γ en levaduras, codificada por el gen *snf4* (figura 4). La interacción entre la proteína SNF4 y la catalítica SNF1 parece estar regulada por glucosa (Ferrando et al., 2001).

Las subunidades γ de animales han sido ampliamente estudiadas. En mamíferos se han identificado tres isoformas $\gamma1$, $\gamma2$ o $\gamma3$ codificadas respectivamente por los genes PRKAG1, PRKAG2 y PRKAG3 (Kemp et al., 1999; Hardie et al., 2006). Las subunidades γ de animales, presentan cuatro motivos en tándem hacia el extremo carboxilo terminal de aproximadamente 60 aminoácidos, denominados dominios CBS (cistation β sintasa; Hardie et al., 1998). Los dominios CBS son altamente conservados en todos los reinos, actúan en pares uniendo AMP o ATP, dependiendo del estado energético de las células. A los pares CBS se les denomina dominios Bateman (Kemp et al., 2003). Mutaciones puntuales en los genes codificadores de la subunidad $\gamma2$ de humanos han sido asociadas con enfermedades del corazón, caracterizadas por almacenamiento excesivo de glucógeno en miocitos cardíacos (Akman et al., 2007). También, se ha observado que una mutación en la subunidad $\gamma3$ de cerdos causa anomalías en el contenido de glucógeno en músculo esquelético (Milan et al., 2000). Las enfermedades mencionadas son ocasionadas porque las mutaciones en la subunidad γ interfieren con la unión de AMP a ella, e inhabilitan su activación; estos resultados dan evidencia de que los dominios Bateman representan los sitios de regulación debida a la unión de AMP en las AMPK (Hardie, 2007a). También, las subunidades γ en levaduras (SNF4) y plantas contienen dos dominios Bateman en tándem hacia el extremo carboxilo terminal, pero a

diferencia de las γ de animales no se ha demostrado que sean reguladas por AMP (Hrabak et al., 2003; Halford et al., 2004).

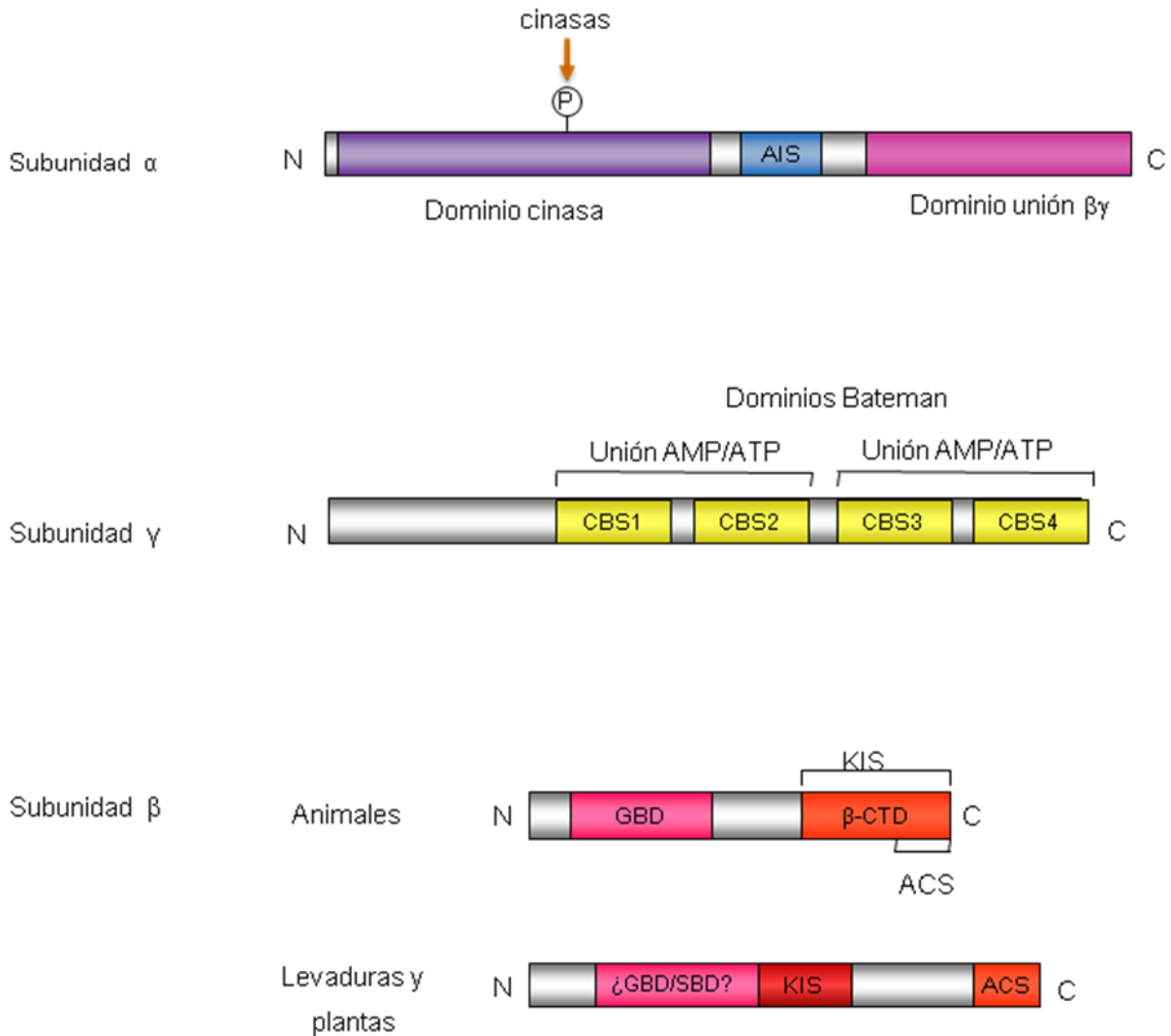


Figura 4. Estructura de las subunidades de las proteínas SNF1/AMPK/SnRK1. La subunidad α contiene un dominio cinasa, un dominio autoinhibitorio (AIS) y un dominio de unión para las subunidades β y γ . La subunidad regulatoria γ presenta cuatro dominios CBS, que en animales actúan en pares para la unión de AMP o ATP dependiendo de las condiciones energéticas. La subunidad β es considerado el andamio de las otras dos subunidades y también presenta un dominio de unión a glucógeno en animales y posiblemente almidón en plantas.

La subunidad reguladora γ en plantas incluye dos grupos el primero por la familia de las PV42/SnIP1 y el segundo por la familia atípica AKIN $\beta\gamma$, llamada así porque contiene características de las dos subunidades reguladoras β y γ .

La familia PV42/SnIP1 incluye a PV42 de frijol (*Phaseolus vulgaris*), AKIN γ de Arabidopsis y SnIP1 de cebada (Slocombe et al., 2002; Halford et al., 2003; Polge y Thomas, 2007). Estas proteínas muestran 20-25% de identidad en su secuencia peptídica con SNF4, interactúan con SnRK1 en ensayos de doble híbrido e *in vitro* y tienen como característica un motivo hidrofóbico corto, llamado motivo SnIP. Parte de este motivo guarda cierto parecido con la secuencia de reconocimiento de SnRK1 sin el residuo de serina blanco y se ha sugerido puede representar un pseudosustrato para la cinasa (Halford et al., 2003).

Dentro del grupo de las AKIN $\beta\gamma$ (figura 5) se encuentran proteínas quiméricas que tienen características tanto de la subunidad γ , como de la β . En ellas se encuentra AtSNF4 de Arabidopsis, que fue capaz de suprimir parcialmente la deficiencia del gen *snf4* en levaduras (Kleinow et al., 2000, Ferrando et al., 2001) y ZmAKIN $\beta\gamma$ de maíz. Se denominan $\beta\gamma$ debido a que contienen un dominio amino terminal de la subunidad β fusionado con un dominio carboxilo terminal similar a SNF4/AMPK y conservando los dominios Bateman (Lumbreras et al., 2001). Las razones de este dominio de fusión no son claros (Halford et al., 2004).

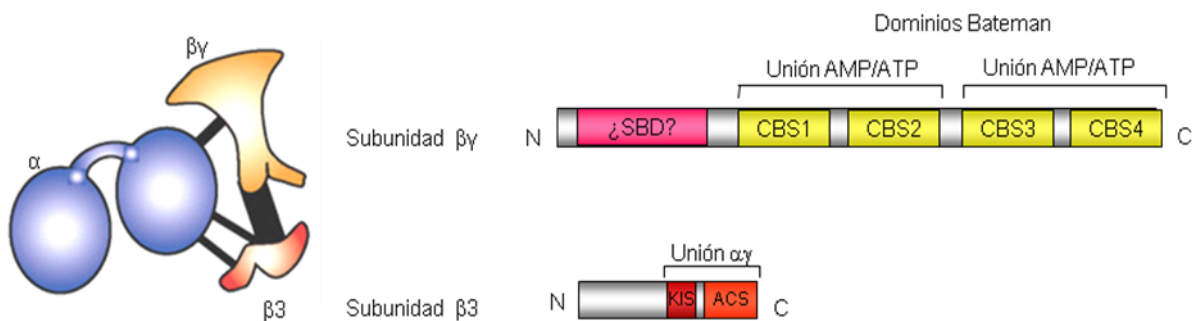


Figura 5. Subunidades atípicas encontradas en plantas. En plantas, se han encontrado dos subunidades reguladoras atípicas: AKIN $\beta\gamma$ resultado de la fusión del dominio SBD de las subunidades β y el dominio carboxilo terminal de la subunidad γ (en maíz y Arabidopsis) y $\beta 3$ que ha perdido el dominio de unión a almidón SBD y la región amino terminal de las subunidades β típicas (en *Arabidopsis thaliana*).

2.7.3 Subunidad regulatoria β

La subunidad β (figura 4) estimula la formación del complejo heterotrimérico porque puede interactuar independientemente con la subunidad α y γ . Tiene dos dominios conservados ASC (“association with SNF1 complex”) en el extremo carboxilo, que permiten la interacción con la subunidad regulatoria γ y el dominio KIS (“kinase interacting sequence”) que a su vez interactúa con la subunidad catalítica en el extremo amino terminal (Halford et al., 2003). En levaduras, esta subunidad es codificada por tres genes que producen las proteínas SIP1, SIP2 y GAL83, cuyo papel es esencial en la especificidad de reconocimiento entre el complejo cinasa y su blanco (Gissot et al., 2006).

Se conocen dos isoformas β en animales AMPK β 1 y AMPK β 2. En mamíferos, a diferencia de las levaduras, parece que el dominio KIS no participa en la formación del complejo $\alpha\beta\gamma$ y sólo el dominio ASC es suficiente para este proceso (Hudson et al., 2005; Iseli et al., 2005). En las subunidades AMPK β , se identificó un dominio de reconocimiento al glucógeno (β -GBD) sobrelapado con el dominio KIS que en algunos casos une glucógeno (Polekhina et al., 2003). Ahora, se sabe que el dominio GBD se presenta en las subunidades beta de los tres reinos, pero su función no es clara (Polge y Thomas, 2007).

En plantas, las subunidades β pueden agruparse en dos clases, una que tiene el dominio GBD, el dominio KIS y el dominio ASC y que, en Arabidopsis, corresponde a las proteínas AKIN β 1 y AKIN β 2 y una subunidad atípica llamada AKIN β 3 (Gissot et al., 2004). La subunidad AKIN β 3 (ver figura 5) parece ser una forma truncada de la subunidad β típica, que ha perdido completamente el dominio GBD así como la región amino terminal. Sin embargo, una de estas proteínas fue capaz de complementar la triple mutante β de levadura, sugiriendo que algunas de las funciones básicas se han conservado (Gissot et al., 2004).

Las subunidades β cumplen un papel importante en la localización de los complejos SnRK1. Recientemente, se identificó que en la etapa de germinación de Arabidopsis la subunidad β 2 se miristila, localizándose en la membrana plasmática. Durante esta etapa se encontró que la actividad SnRK1 disminuía (Pierre et al., 2007).

En los tres reinos puede observarse la existencia de más de un gen para cada subunidad, esto sugiere que las combinaciones de las subunidades α , β y γ para formar los heterotrimeros les dan la capacidad de realizar funciones distintas.

2.8 Regulación de la familia de cinasas AMPK/SNF1/SnRK1

La activación de AMPK/SNF1/SnRK1 está dada por cinasas río arriba que regulan la fosforilación de una Thr en el T-loop de la subunidad catalítica (ver figura 4). En levaduras, se han identificado tres tipos: SAK1, ELM1 y TOS3; en mamíferos dos, LKB1, y CaMKK2 (Hardie et al., 2006) y en plantas, recientemente se han encontrado enzimas capaces de fosforilar a SnRK1. En Arabidopsis, se encontraron dos tipos AtSnAK1 y AtSnAK2 (de Arabidopsis thaliana SnRK1-activating kinase), las cuales complementaron a la triple mutante de levadura *elm1 sak1 tos3* (Hey et al., 2007). Además de la fosforilación directamente en el asa de activación, las enzimas AMPK/SNF1/SnRK1 se activan mediante la liberación de la autoinhibición de la subunidad catalítica. En levaduras, el sistema responde ante una baja de glucosa de manera que SNF4 se une a SNF1. El dominio de autoinhibición de SNF1 sufre un cambio conformacional y libera al sitio catalítico. En animales, durante un estrés metabólico como lo es el ejercicio vigoroso, la deficiencia de nutrientes, la isquemia o la hipoxia, disminuye el contenido energético en forma de ATP. En estos casos, los dominios Bateman de la subunidad regulatoria γ actúan uniendo AMP y/o ATP, determinando el estado energético celular. Ante un aumento en la concentración de AMP, es decir, una disminución en la relación AMP/ATP (la cual debe ser de 1:100 en condiciones normales), la enzima une preferencialmente AMP, en caso contrario el ATP desplazará completamente la unión de AMP (Scott et al., 2004).

Si las condiciones energéticas en el organismo no son favorables, la subunidad γ teniendo todos los dominios Bateman ocupados por AMP se unirá a la subunidad α y la activará (Hardie et al., 2000; Hardie et al., 2006).

El AMP tiene tres funciones en la activación de AMPK: a) unión a la subunidad γ , haciendo a AMPK un mejor sustrato para las cinasas río arriba, b) activación alostérica de AMPK y c) unión a AMPK produciendo un mal sustrato para fosfatasa río abajo (revisado por Hardie et al., 1998).

En las plantas la activación de SnRK1 responde a un déficit energético como resultado a diversos tipos de estrés, tal como el ataque por patógenos (Hao et al., 2003) o herbívoros (Schwachtje et al., 2006), la deficiencia nutrimental (Baena-González et al., 2007) y la oscuridad (Thelander et al., 2004). Recientemente, se ha observado que la cinasa es regulada por azúcares. Plantas transgénicas sobreproductoras de AKIN10 de *Arabidopsis thaliana* disminuyeron la actividad SnRK1 cuando se suplementaron con sacarosa y glucosa (Baena-González et al., 2007).

Para que las enzimas AMPK/SNF1/SnRK1 sean activas, debe mantenerse la inhibición de proteínas fosfatasas, las cuales desfosforilan la Thr del asa de activación de la subunidad catalítica. Hasta ahora, pocos estudios han abordado la actividad de las fosfatasas involucradas en esta regulación. En animales, la desfosforilación se lleva a cabo por PP2A (Protein phosphatase-2A) o por PP2C (Protein phosphatase-2C; Hardie et al., 2006) y en levaduras por REG1-GLC7 (revisado por Polge y Thomas, 2007).

2.9 Función de los complejos AMPK/SNF1/SnRK1

Los miembros de la familia de cinasas AMPK/SNF1/SnRK1, son componentes centrales de las cascadas de señalización, que actúan como sensores metabólicos monitoreando el contenido energético de los organismos. Mediante la fosforilación de aminoácidos Ser o Thr localizados en enzimas clave, inactivan rutas metabólicas que consumen ATP e inducen algunas que lo producen (Hardie et al., 1998).

Se ha observado, que la familia AMPK/SNF1/SnRK1 presenta blancos metabólicos comunes en los tres reinos y mediante alineamientos de las secuencias de estas proteínas se identificó un motivo de reconocimiento para las cinasas Hid-(X, Arg)(X, Bas)-X-X-Ser/Thr-X-X-X-Hid (figura 6) con residuos de aminoácidos altamente conservados en la posición -5, -3 y +4 con respecto a Ser/Thr, donde Hid es un aminoácido con cadena lateral hidrofóbica (L, M, I, F o V); Bas, se refiere a un aminoácido con cadena lateral básica (R>K>H), X a cualquier tipo de aminoácido y la posición de los aminoácidos entre paréntesis no es crítica en sus sustratos. Dichos datos permitieron desarrollar péptidos sintéticos: SAMS (HMRSAMSGHLHLVKRR) y AMARA (AMARAASAAALARRR), que son sustratos específicos para esta familia de cinasas y que

actualmente son utilizados para determinar la actividad cinasa debida a enzimas tipo SNF1 (Hardie et al., 1998; Halford et al., 2004).

-5		-3							+4
Met	Xxx	Arg	Xxx	Xxx	Ser	Xxx	Xxx	Xxx	Leu
Leu		Lys			Thr				Phe
Val		His							Ile
Phe	Arg	Xxx							Met
Ile									Val

Figura 6. Sitios de fosforilación para SNF1, AMPK y SnRK1. Los residuos indispensables (coloreados) son Ser/Thr, residuos hidrofóbicos en la posición +4 y -5 con respecto a la serina y un residuo básico en -3 o (menos preferiblemente) en -4 (adaptado de Halford et al., 2004).

2.9.1 SNF1 es un controlador que permite adaptación a la fuente de energía

En escasez de glucosa, las células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pueden cambiar su metabolismo de fermentativo a oxidativo para poder utilizar el etanol formado durante la fermentación de glucosa (Rolland et al., 2006), o bien, utilizar otras fuentes alternativas de carbono para producir ATP y poder subsistir (Polge y Thomas, 2007). SNF1 tiene un papel indispensable en estos cambios, debido a que mutantes $\Delta snf1$ requieren esencialmente glucosa para sobrevivir (figura 7) y mueren en un medio que contenga otros azúcares incluyendo la sacarosa, la galactosa y la maltosa u otras fuentes de carbono no fermentables tales como el glicerol o el etanol, debido a su inhabilidad de encender genes necesarios en respuesta a deficiencia de glucosa (Halford et al., 2003).

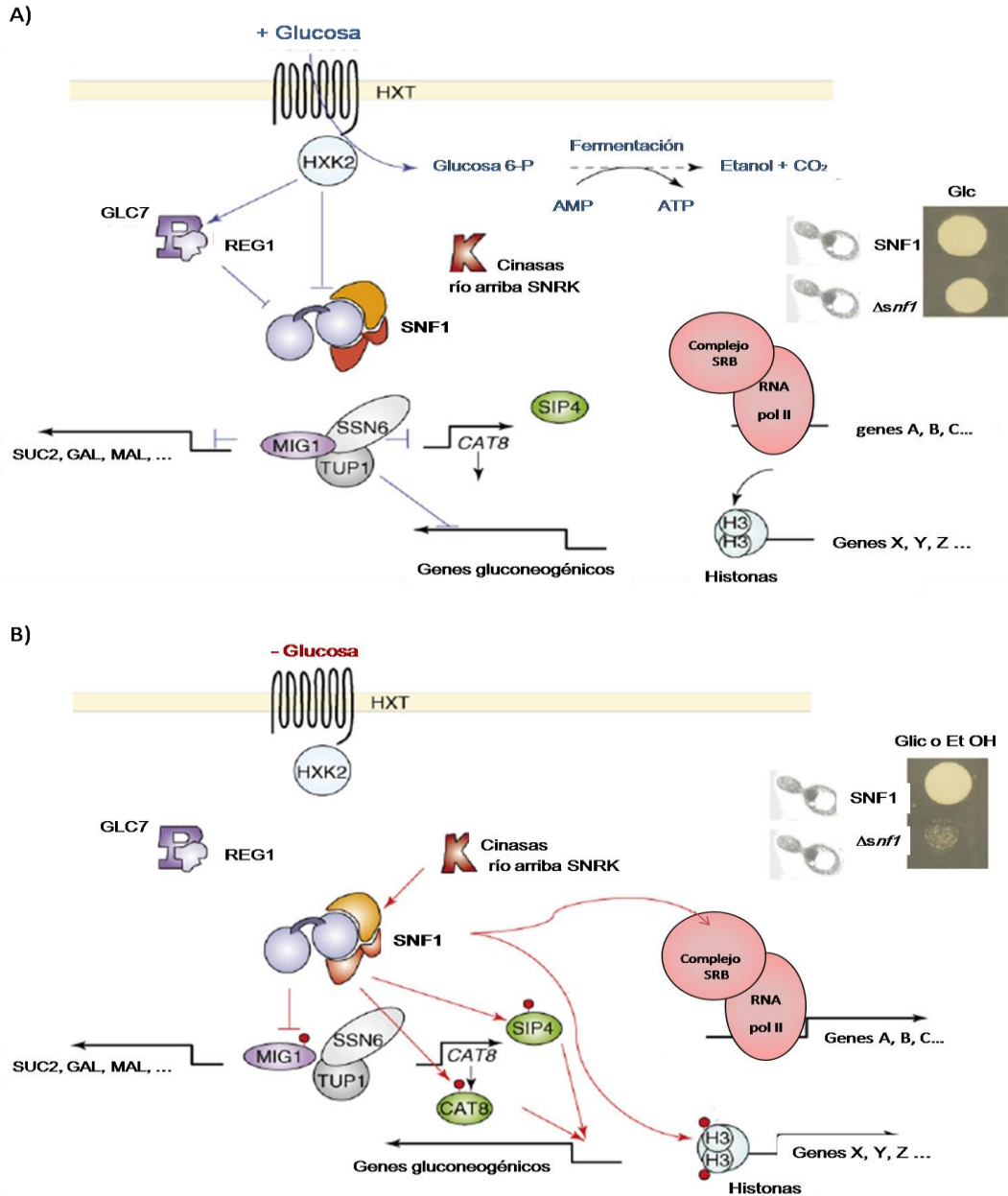


Figura 7. SNF1 regula la toma de fuentes alternativas de carbono a glucosa. A) en presencia de glucosa, el ATP es producido por fermentación, SNF1 es inhibido vía la hexocinasa HXK2 y el complejo fosfatasa REG1-GLC7. En este caso, los genes implicados en la utilización de fuentes de carbono no fermentables son reprimidos por el complejo represor SSN6-TUP1-MIG1. B) Cuando la glucosa está ausente en el medio, SNRK1 es activada por cinasas río arriba (ELM1, TOS3 y PAK1). Una vez activa SNF1 fosforila a MIG1 que se trasloca al citoplasma y de este modo se encienden los genes reprimidos por la disociación SSN6-TUP1-MIG1. SNF1 actúa directamente sobre activadores transcripcionales tales como SIP4 y CAT8. El amplio papel de la SNF1 en la activación de la expresión de genes puede deberse a su efecto positivo en la RNA polIII a través del complejo SRB. EtOH: etanol; Gluc: glucosa, Glic: Glicerol (tomado de Polge y Thomas, 2007).

El papel principal de SNF1 en levaduras, es fosforilar y mantener inactivo a Mig1, un represor transcripcional que inhibe la expresión de genes durante el crecimiento en un medio que contiene glucosa. En ausencia de glucosa, SNF1 se activa y fosforila a Mig1 quien se trasloca al citoplasma, liberando a los genes blanco de su represión, permitiendo así el metabolismo de fuentes alternas de carbono (Polge y Thomas, 2007; Hedbacker y Carlson, 2008). En un análisis global de la expresión genética de las levaduras durante la inanición con glucosa, se demostró que un cuarto de los transcritos del genoma de *S. cerevisiae* es modificado; 409 de los 2126 genes de levadura, son dependientes de SNF1 y codifican para proteínas involucradas en la transcripción, el señalamiento, el metabolismo de carbohidratos y la respiración (Young et al., 2003). Esto se debe a que SNF1 interactúa con diferentes miembros de la maquinaria transcripcional. SNF1 modula directamente el complejo RNA polimerasa II vía su interacción con el complejo mediador SRB, fosforila la histona H3, regulando la unión de la proteína TBP (TATA –binding protein) a sus promotores (Polge y Thomas, 2007).

2.9.2 AMPK regula la demanda energética en los organismos

La AMPK es un regulador metabólico (figura 8) involucrado en la homeostasis energética de las células y del organismo (Hardie y Sakamoto, 2006).

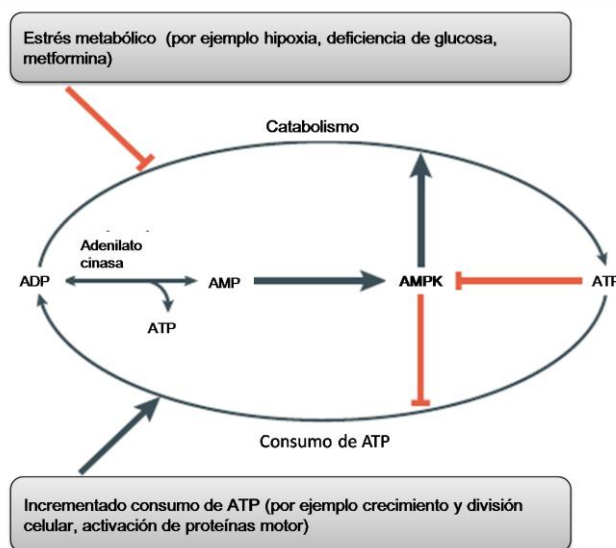


Figura 8. Regulación de la homeostasis energética por el sistema AMPK. Bajo condiciones no estresantes, el catabolismo mantiene altas relaciones ATP:ADP en el orden 10:1. Esto dirige la reacción de la adenilato cinasa a favor de la síntesis de ADP y, consecuentemente, la relación celular AMP:ATP (1:100) es baja y la AMPK es inactiva. Si la célula es sujeta a estrés metabólico que interfiera con la síntesis de ATP (por ejemplo hipoxia, deficiencia de glucosa o inhibidores metabólicos tales como la metformina) o estreses que aceleran el consumo de ATP, la

relación ATP:ADP tiende a disminuir, por ejemplo, una relación 2:1, incrementa la relación AMP:ATP 25 veces suficientes para que AMPK se active. AMPK activa regula la homeostasis de energía, ya que, promueve el catabolismo e inhibe procesos que consumen ATP (Hardie, 2007b; Hardie et al., 1998).

La enzima AMPK se activa durante diferentes tipos de estrés metabólico como los que inhiben la producción de ATP (por ejemplo hipoxia, deficiencia de glucosa o adición de inhibidores metabólicos) o aquellos que estimulan el consumo de ATP a nivel celular, por ejemplo activación de proteínas motores, bombas, canales iónicos y rutas biosintéticas. También, es modulado por citocinas que regulan el balance de energía de todo el organismo, incluyendo leptina, adiponectina, ghrelina, cannabinoides, interleucina-6 (Ruderman et al., 2006) y por drogas utilizadas para el tratamiento de diabetes tipo 2 (incluyendo metformina y thiazolidinedionas).

Una vez activada, AMPK enciende rutas catabólicas que producen ATP (ver figura 9), tales como la oxidación de ácidos grasos, mientras que apaga rutas biosintéticas u otras que consumen ATP, por ejemplo la síntesis de ácidos grasos y colesterol, en este caso a través de la inactivación de la acetil CoA carboxilasa y HMG-CoA reductasa (Hardie et al., 2006). En animales AMPK está involucrada en una variedad de desordenes metabólicos tales como la diabetes y obesidad (Polge y Thomas, 2007).

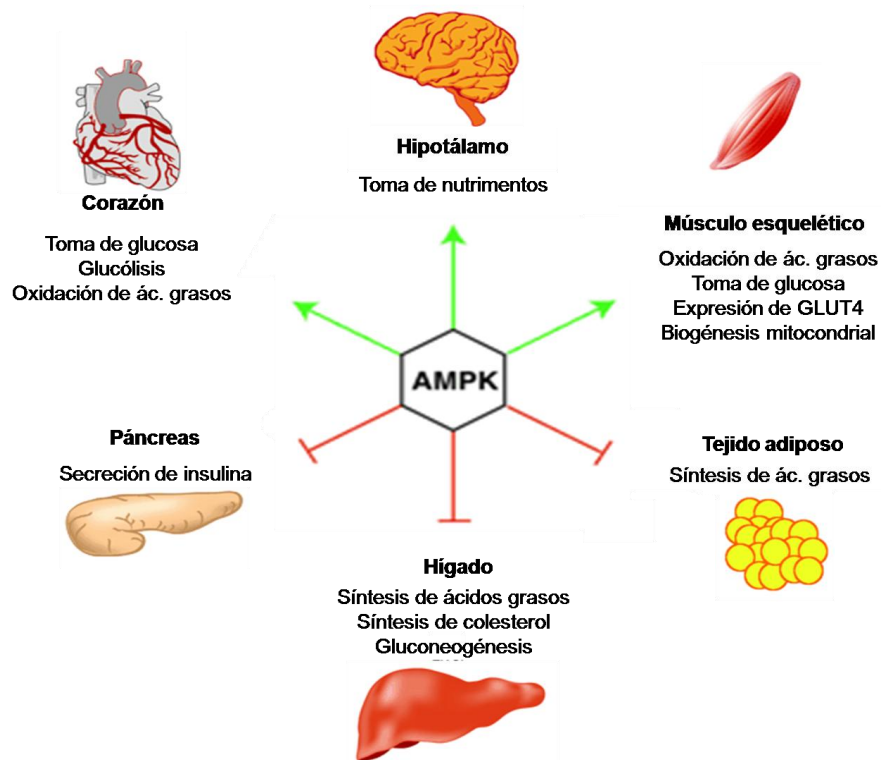


Figura 9. Procesos clave del metabolismo energético que son regulados por AMPK. Las líneas verdes indican activación y las rojas indican inhibición de rutas metabólicas, también, se indican los órganos en donde se lleva a cabo la regulación por AMPK en mamíferos. Tomado de Hardie (2004).

2.9.3 SnRK1 regula el metabolismo global de la planta

El estudio de las SnRK1 en plantas es más reciente que la de sus homólogos. Inicialmente, su papel se infirió a partir de resultados obtenidos en experimentos *in vitro*, en los que se observó que fosforilaba e inactivaba a la 3-hydroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa (HMGC_oA) implicada en la síntesis de esteroides e isoprenoides, a la sacarosa fosfato sintasa (SPS), que participa en la síntesis de sacarosa, a la nitrato reductasa (NR) implicada en la asimilación de nitrógeno (Halford y Hardie, 1998) y la trealosa 5 fosfato sintasa (TPS5), una enzima clave en la síntesis de trealosa 6 fosfato (figura 5), azúcar que regula la síntesis de almidón vía la activación redox de la enzima AGPasa (Kolbe et al., 2005; Harthill et al., 2006).

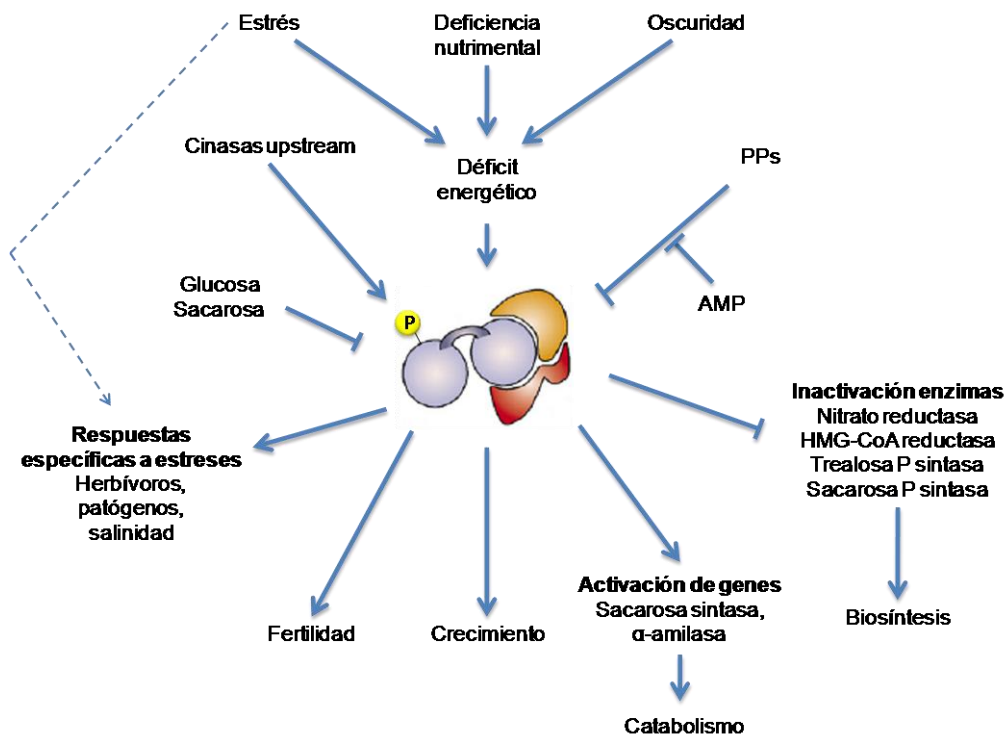


Figura 10. SnRK1 es un regulador energético global de la planta. Diversos estímulos tales como la deficiencia nutrimental, la oscuridad y diversos tipos de estrés se traducen en un déficit energético, lo cual estimula la activación del complejo heterotrimérico SnRK1 mediante la fosforilación de un residuo de Thr altamente conservado por cinasas río arriba y la inhibición de fosfatasas de SnRK1 debido a un aumento de AMP (indicador de déficit energético). Una vez activada SnRK1 inactiva enzimas clave en procesos biosintéticos, activa genes involucrados en catabolismo para generación de energía. SnRK1 actúa positivamente durante el crecimiento, es indispensable en los procesos de fertilidad y permite responder específicamente a diversos tipos de estrés (adaptado de Baena-González y Sheen, 2008).

SnRK1 también regula positivamente la transcripción de diversos genes implicados en el metabolismo del carbono, tal es el caso de la sacarosa sintasa (degradación de sacarosa; Halford et al., 2004) y la α -amilasa (degradación de almidón; Laurie et al., 2003). Un estudio mediante microarreglos realizado en plantas mutantes para la subunidad *akin10* de *A. thaliana* mostró que SnRK1 detecta el déficit energético producido por periodos de oscuridad y dirige la inducción (280 genes) y represión (320 genes) de genes implicados en diversos procesos (Baena-González y Sheen, 2008).

La carencia de la enzima SnRK1 repercute en el desarrollo de la planta, acelera la senescencia y la floración, y, detiene el crecimiento de las plantas (Baena-González et al., 2007). En cebada el gen SnRK1 expresado en antisentido mostró un desarrollo anormal de los granos de polen, los cuales fueron pequeños, y contenían poco o casi nada de almidón (Zhang et al., 2001). La doble mutante transitoria *akin10akin11* de *Arabidopsis thaliana*, disminuyó la movilización de almidón durante la oscuridad, seis veces con respecto al control y su crecimiento fue drásticamente inhibido (Baena-González, 2007).

SnRK1 también está implicado en respuestas a estrés. Plantas transgénicas de papa que expresaban en antisentido una subunidad β (StubGAL83), mostraron hipersensibilidad a la salinidad, lo cual sugirió que SnRK1 puede activar sistemas de protección contra estrés salino (Lovas et al., 2003). En tabaco, una secuencia antisentido de la subunidad catalítica SnRK1 de *Arabidopsis* incrementó su sensibilidad al ataque por virus, mientras, la sobreexpresión de una secuencia en sentido incrementó su resistencia, sugiriendo que SnRK1 puede ser un componente de la defensa antiviral de la planta (Hao et al., 2003). Los mecanismos de defensa a herbívoros se han estudiado en *Nicotiana attenuata*. Después de estimular el ataque por herbívoros, se incrementó la relocalización de azúcares hacia la raíz, este proceso está mediado por la regulación de la subunidad β de SnRK1 llamada GAL83 (Schwachtje et al., 2006) y, en *Arabidopsis*, se sugiere que la subunidad específica AKIN β interactúa con dos proteínas (AtHSPRO1/2) involucradas en la resistencia a nematodos a través su dominio GBD (Gissot et al., 2006).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio, indican que la actividad cinasa tipo SnRK1 decrece durante la deficiencia de Pi. El estudio que apoya lo anterior se realizó en plantas silvestres y en

mutantes que no expresan la subunidad catalítica AKIN10 (Fragoso et al., 2009). En condiciones suficientes de Pi, las plantas silvestres y mutantes *akin10* presentan los mismos niveles actividad cinasa tipo SnRK1. En deficiencia de Pi, la actividad de las plantas silvestres disminuye 30% y en las mutantes *akin10* esta disminución es del 48% con respecto a condiciones de suficiencia de Pi. Un hecho importante en esta investigación, es que las plantas mutantes *akin10* no pierden la actividad de cinasa SnRK1, lo cual nos hace suponer que pueden existir otros complejos SnRK1 que involucren a otras subunidades catalíticas, en particular AKIN11, y, que su expresión y actividad estén reguladas por deficiencia de Pi. En este sentido, la hipótesis planteada es la siguiente:

3. HIPÓTESIS

La expresión de *akin11* y la actividad tipo SnRK1 de los complejos formados por esta subunidad en *Arabidopsis thaliana* están regulados en respuesta a la deficiencia de fosfato.

4. OBJETIVO GENERAL

Analizar los niveles de expresión y actividad de la subunidad catalítica AKIN11 del complejo heterotrimérico SnRK1 en plantas de *Arabidopsis thaliana* creciendo en condiciones de deficiencia de fosfato.

4.1 Objetivos específicos

1. Determinar la expresión del gen *akin11* a nivel de ARNm por RT-PCR en condiciones nutrimentales suficientes y deficientes de fosfato.
2. Obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresen la proteína AKIN11 fusionada con GFP.
3. Identificar los sitios de localización de AKIN11 a través de la fluorescencia de GFP.
4. Cuantificar el contenido proteico y la actividad cinasa de AKIN11 en plantas que crecieron en condiciones nutrimentales suficientes y deficientes de Pi.

5. METODOLOGÍA

5.1 Condiciones de crecimiento y tratamiento

Semillas de plantas silvestres de *A. thaliana* ecotipo Columbia, así como de plantas transgénicas (AKIN11-GFP y GFP-CONTROL) fueron sembradas en tierra comercial (Metro mix 200) humedecida con agua desionizada hasta saturación. Las macetas permanecieron en oscuridad a 4°C por dos días para romper la dormancia y homologar la germinación. Pasando este tiempo las macetas se transfirieron al invernadero en condiciones de fotoperiodo corto (16h de oscuridad por 8h de luz) y temperatura en un rango de 21 a 23 °C. En el caso de las plántulas provenientes de semillas transgénicas, después de una semana de germinación fueron asperjadas con una solución 300 µM de glufosinato de amonio (de nombre comercial PESTANAL de laboratorios SIGMA-ALDRICH) para su selección. La aspersion se repitió dos veces más en un lapso de 4 días. Una semana después de la selección, las plantas sobrevivientes se transplantaron a tierra nueva.

Para el tratamiento de deficiencia nutrimental, plantas de tres semanas de crecimiento se transplantaron a agrolita humedecida con agua desionizada, y, se mantuvieron cubiertas con una tapa transparente por una semana, para acondicionar a las plantas. Después de este periodo, la mitad de las plantas se trataron con medio Hoagland con fosfato (6 mM KNO₃, 4 mM Ca(NO₃)₂·H₂O, 1 mM NH₄H₂PO₄, 2 mM Mg(SO₄)₂·7H₂O, 0.009 mM MnCl₂·4H₂O, 0.046 mM HBO₃, 0.0008 mM ZnSO₄·7H₂O, 0.0003 mM CuSO₄·5H₂O, 0.0001 mM H₂MoO₄·H₂O, 0.01 g/l Fe (III) EDTA) y la otra mitad con medio Hoagland sin fosfato, sustituyendo el fosfato de amonio por sulfato de amonio. Muestras de roseta de estas plantas fueron tomadas a 5, 10 y 15 días de tratamiento, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.2 RT-PCR

Se tomaron muestras de hojas de roseta de *A. thaliana* ecotipo Columbia crecidas por 5 y 10 días en deficiencia de fosfato y se extrajo el ARN por el método de TRIZOL (Invitrogen). Las muestras de ARN total fueron cuantificadas espectrofométricamente a una longitud de onda de 260 nm. Para cuantificar la concentración de ácidos nucleicos se utilizó la relación:

1.0 unidad de Absorbancia = 40 μg ARN/ml .

La transcripción reversa de los ARNm se llevó a cabo utilizando 5 μg de ARN total, un cebador de oligo dT, y la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.

El ADNc de *akin11* se amplificó por PCR utilizando la enzima Taq polimerasa recombinante (Invitrogen) y los siguientes cebadores:

AK11RTFw: 5'-GGTTTAGCTGATGGTCACAATACTATGGT-3' y

AK11RTRev: 5'-GGATAGTTACTATTACAGTAGAGTTTAAC-3'.

Como control nutricional el gen *At4*, que se estimula por deficiencia de fosfato se amplificó con el siguiente par de oligonucleótidos:

At4Fw: 5'-CCCCTAAAGAAACTGAAGCTCAAGAA-3' y

At4Rev: 5'-GGAACATAAACATATAAGAGCTAT-3'.

Como control interno se utilizó el gen de actina, amplificado con los siguientes cebadores:

actina Fw: 5'-TGGGGCAGAAGGATGCGTATG-3' y

actina Rev: 5'-CAATACCAGTTGTACGGCCAC-3'

Las PCRs se realizaron en un termociclador 2720 Thermal Cycler, Perkin Elmer con el siguiente programa: 1 ciclo 94°C, 35 ciclos de 0.5 min 94°C, 1 min 55°C, y 0.5 min 74°C, por último, un ciclo de 10 min 74°C.

5.3 Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos

Se prepararon geles de agarosa al 1% en buffer TAE (Tris-acetato, EDTA) utilizando bromuro de etidio para la visualización de los productos con luz ultravioleta (Sambrook, 1998).

5.4 Transformación de *A. thaliana* por el método de infiltración

En el laboratorio se contaba con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* transformada con un vector binario del sistema Gateway (pEarlyGate 103), que contenía el ADNc de la subunidad catalítica *akin11*. El vector permitió fusionar río arriba al ADNc de *akin11* con el gen reportero para la GFP. La transcripción de la proteína quimérica se encontró bajo la regulación del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Un cultivo de *A. tumefaciens* se utilizó para

infectar plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia por el método de inmersión (Logemann et al., 2006). El cultivo se mantuvo con agitación constante (250 rpm) a 28°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.8. Las células se centrifugaron a 5,000 X *g* durante 5 minutos a 4°C. El paquete celular se resuspendió en 150 ml de una solución que contenía 5% de sacarosa, 0.01% silwet L-77.

La transformación se realizó con plantas de *Arabidopsis* a las que se les había cortado previamente la primera inflorescencia, para romper con la dominancia apical y generar ramificaciones. Estas plantas contenían botones florales en varios estadios de desarrollo. La parte aérea de estas plantas se sumergió en la suspensión bacteriana durante 1 minuto. Las plantas se mantuvieron durante una noche a temperatura ambiente, en oscuridad, y, posteriormente, se trasladaron al invernadero manteniendo un fotoperiodo largo (16 h de luz por 8 h de oscuridad). Las semillas obtenidas (identificadas como AKIN11-GFP) de cada planta se cosecharon independientemente y se almacenaron a 4°C hasta su uso. También se transformaron plantas de *A. thaliana* ecotipo Columbia con el vector pEarlyGate 103 sin inserto que expresaban solamente GFP (plantas identificadas como GFP-CONTROL).

5.5 Selección de plantas transgénicas

Se desinfectaron semillas de plantas transgénicas y control utilizando una solución de hipoclorito de sodio (50% NaOCl, 0.006% Tween 20) durante 1 min, agitando vigorosamente para dispersar a las semillas. Las semillas se lavaron con abundante agua estéril y se sembraron en cajas petri con medio Gamborg B5-agar, utilizando 300 µM de glufosinato de amonio como medio de selección. Las semillas fueron puestas en oscuridad por 48 h a 4°C y se trasladaron a cámaras de crecimiento con un fotoperiodo corto (8 h luz por 16 h oscuridad) y una temperatura entre 21-23°C. Después de que las semillas germinaron, las plántulas sobrevivientes se transplantaron a tierra (Metro mix 200). Las plantas crecieron bajo fotoperiodo largo y las semillas de las plantas seleccionadas se cosecharon nuevamente.

Para corroborar que las plantas resistentes al glufosinato de amonio fueran transgénicas, se aisló ADN genómico y se realizó una reacción de PCR por cada planta, utilizando los siguientes oligonucleótidos:

AK11RTFw: 5'-GGTTTAGCTGATGGTCACAATACTATGGT-3' y

GFPprev: 5'-GTAAAAGGACAGGGCCATCGCC-3'.

El producto de la PCR posteriormente fue purificado y secuenciado para corroborar la identidad de *Akin11*.

5.6 Localización celular de la enzima AKIN11

Mediante microscopía confocal realizamos observaciones, de cortes finos de hoja de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de las líneas AKIN11-GFP 6 y 12, con el objeto de determinar la localización de la proteína de fusión AKIN11-GFP en condiciones suficientes y deficientes de Pi después de 5 y 10 días de tratamiento, como control se utilizaron plantas GFP-CONTROL 5 y silvestres.

Para el análisis de la localización de la proteína a través de la fluorescencia de la GFP, se utilizó el microscopio Confocal Olympus FV1000 (FluoView®1000), en la Unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

5.7 Inmunodetección de la proteína de fusión AKIN11-GFP

Se realizó la inmunodetección de la proteína de fusión AKIN11-GFP de plantas transgénicas que estuvieron en tratamiento de suficiencia y deficiencia de Pi por 5 y 10 días.

La metodología utilizada fue dividida en tres partes: la extracción e inmunoprecipitación de proteínas, la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante por SDS y el Western blot para la interacción AKIN11-GFP - Anti-GFP, las cuales se describen a continuación.

5.7.1 Extracción e Inmunoprecipitación de proteínas

0.1 g de tejido de hoja fue pulverizado con nitrógeno líquido. Para extraer las proteínas, se adicionó 1 ml de buffer de extracción (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM leupeptina, 0.1 mM benzamidina, 0.1 mM PMSF, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 1 mM β-glicerol fosfato) hasta obtener una suspensión homogénea.

Las muestras se transfirieron a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 20 000 X *g* durante 10 min. El sobrenadante se recuperó en tubos Eppendorf y se incubó con 1 µl de anticuerpo anti-GFP (1 mg/ml) diluido en 6 µl de PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM

KH₂PO₄, pH 7.4) durante toda la noche a 4°C. Los inmunoprecipitados se incubaron con la proteína A agarosa (Protein A agarose Fast Flow de SIGMA) por una hora, a temperatura ambiente. Los inmunoprecipitados adheridos a la proteína A agarosa se lavaron cuatro veces con buffer A (10mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA) y se colectaron por centrifugación. En el último lavado, se desechó el sobrenadante y los complejos inmunoprecipitados-proteína A agarosa se resuspendieron en 20 µl de buffer de carga (60 mM Tris, pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.001% azul de bromofenol, 10% Glicerol), esta mezcla se colocó en un baño a ebullición durante 3 min.

Como control se utilizó 20 µl de extracto proteico total de tejido de hoja de plantas GFP-CONTROL y se adicionó 5 µl de buffer de carga, siguiendo el mismo procedimiento previamente descrito, sin el paso de inmunoprecipitación.

5.7.2 Electroforesis en Gel de poliacrilamida-SDS

Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (PAGE-SDS) al 12%. La electroforesis se realizó de acuerdo a lo indicado en Laemmli (1970).

5.7.3 Western blot

Las proteínas separadas en el SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, utilizando el sistema húmedo de BIO RAD.

Para verificar la transferencia de las proteínas, la membrana se tiñó con una solución de rojo de Ponceau (1% rojo de Ponceau S, 0.1% ácido acético) por 3 min y se lavó con agua destilada. La membrana se bloqueó en un buffer que contenía 1X PBST (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 0.1% Tween-20) y 5% leche descremada, durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo contra GFP (Sigma) se utilizó en una dilución de 1:2 000 y se incubó a 4°C, toda la noche. La membrana se lavó con una solución de PBST-1M NaCl por 15 min, seguido de tres lavados de 10 min cada uno con PBST.

La incubación de la membrana con el segundo anticuerpo se realizó durante 1 h a temperatura ambiente. La dilución utilizada para el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa fue de 1:40 000 como recomienda la casa comercial (GE, Amersham). El segundo anticuerpo se

removió con tres lavados de PBST, durante 10 min. La detección de las proteínas se realizó utilizando el ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Amershan).

5.8 Actividad cinasa

La actividad de cinasa SnRK1 de las plantas transgénicas y controles creciendo en suficiencia o deficiencia de fosfato, se determinó de acuerdo al protocolo descrito por Davies (1989). Esta metodología se divide en tres pasos: la extracción y precipitación del complejo SnRK1, la reacción de fosforilación del péptido SAMS y la cuantificación del ³²P incorporado al péptido SAMS.

5.8.1 Extracción y precipitación del complejo SnRK1

Se maceró 0.1 g de tejido de hoja con N₂ líquido hasta tener un polvo muy fino. Se agregó 1 ml de buffer de extracción (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM leupeptina, 0.1 mM benzamidina, 0.1 mM PMSF, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM β-glicerol fosfato, 50 mM NaF) hasta la obtención de una suspensión homogénea. La mezcla se centrifugó durante 10 min a 20 000 X *g*, 4 °C y se recuperó el sobrenadante. La proteína se precipitó agregando PEG 10 000, hasta alcanzar una concentración del 11% (P/V). La muestra se agitó, durante 20 min adicionales a 4°C y la proteína se precipitó por centrifugación a 20 000 X *g*, durante 30 min. El precipitado se resuspendió en 30 µl del buffer de extracción y la cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (1976).

5.8.2 Reacción de fosforilación del péptido SAMS

La fosforilación del péptido SAMS (HMRSAMSGHLVKRR) se ensayó en un volumen final de 25 µl que contenía amortiguador de reacción para cinasas (40 mM Hepes pH 7.0, 50 mM NaF, 25 mM β-glicerolfosfato, 50 mM NaCl, 8% (V/V) glicerol, 0.8 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 200 µM péptido SAMS, 200 µM AMP, γ-³²P]ATP (200 µM, 5 µCi/µl, 3000 Ci/mmol)) y 1-3 µg de la proteína extraída de las muestras. Después de incubar por 10 min a 30°C, una alícuota de 15 µl se removió y se colocó en papel de fosfocelulosa (P81, Whatman), el cuál se lavó inmediatamente en un recipiente que contenía 500 ml de una

solución de ácido fosfórico al 1% (V/V). Los filtros se lavaron durante 20 min en tres cambios de la misma solución. Al final, se lavaron con acetona y se dejaron secar.

5.8.3 Cuantificación de ^{32}P incorporado al péptido SAMS

Para determinar la cantidad de ^{32}P incorporado, los filtros se colocaron en viales con líquido de centelleo (5 g/l 2, 5-difeniloxazol (PPO), 0.1 g/l p-fenilen-bis-[5-feniloxazol] (POPOP), utilizando como disolvente tolueno) y las cuentas por minuto (CPM) se determinaron en un contador de centelleo (LS6000/C BECKMAN).

6. RESULTADOS

6.1 Expresión del gen *akin11* en condiciones suficientes de Pi

Se inició el estudio de la expresión del gen *akin11* en condiciones suficientes de Pi a nivel de transcrito. La base de datos de microarreglos pública GENEVESTIGATOR (Zimmermann et al., 2004) indica que *akin11* es un gen constitutivo, que mantiene sus niveles de transcrito relativamente constantes durante los diferentes estadios de desarrollo de *Arabidopsis* (figura 11), excepto en silicua, que presenta un incremento de 173%, con respecto a las demás etapas.

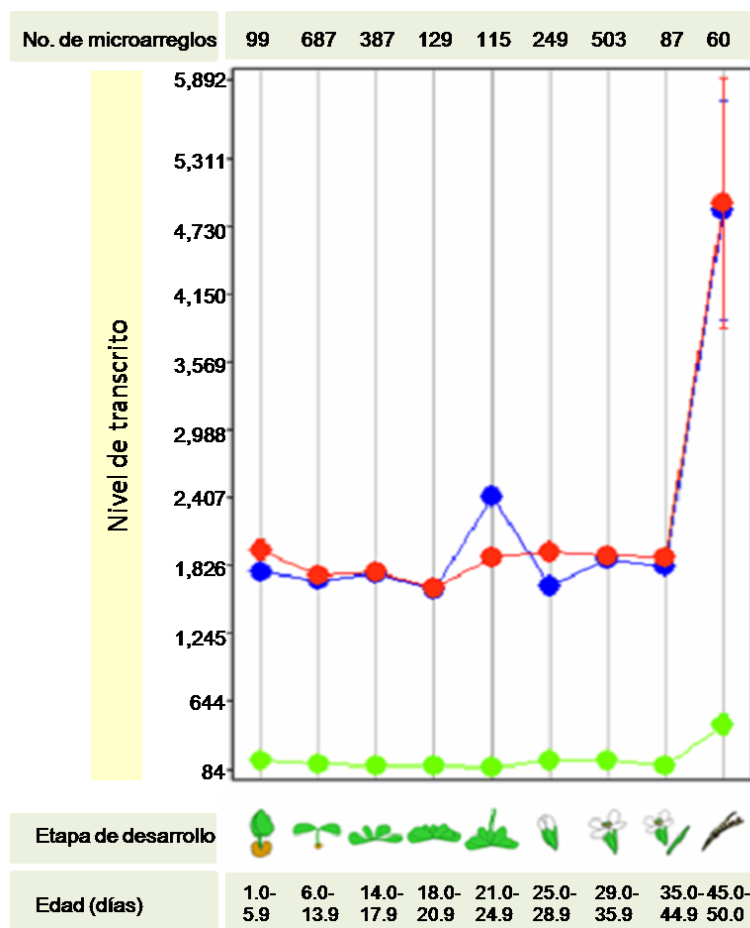


Figura 11. Expresión de los genes codificantes de la subunidad catalítica SnRK1 en diferentes etapas de desarrollo. ● *akin11*, ● *akin10*, ● *akin12*. Tomado de Zimmermann, et al., 2004

El gen *akin11* tiene dos homólogos, *akin10* y *akin12*, para determinar si existen diferencias en la expresión entre éstos genes, se comparó su nivel de transcripción en la base de datos GENEVESTIGATOR (figura 11). *akin12* presenta un nivel de expresión 1700 veces menor que sus homólogos en la mayor parte del ciclo de vida de la planta. AKIN12 se considera una secuencia hipotética que difiere de AKIN10 y AKIN11 por numerosos aminoácidos intercambiados en su región regulatoria carboxilo terminal (Bhalerao et al., 1999). Por ello, suponemos que la cantidad de complejos enzimáticos que se formen con esta subunidad serían muy pocos, sobre todo en etapa de roseta, o bien, que su expresión o actividad podría regularse de manera diferente a las otras subunidades.

Los niveles de expresión de *akin10* y *akin11* son muy semejantes, en las distintas etapas de desarrollo. Los productos de estos genes tienen alto grado de identidad en sus secuencias peptídicas (81%), presentando las mayores diferencias hacia el extremo carboxilo terminal (Bhalerao et al., 1999), lo que permite suponer que algunas de sus funciones son redundantes.

6.2 Expresión del gen *AKIN11* en deficiencia de fósforo

Plantas silvestres de *A. thaliana* ecotipo Columbia de aproximadamente un mes de edad se crecieron en condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo. Las plantas empezaron a presentar síntomas de deficiencia desde los 5 días de tratamiento. Estos síntomas incluían tamaño pequeño de la roseta, 1.7 veces menor que las que crecieron en suficiencia de Pi y coloración verde oscuro en hojas (figura 12; Fredeen et al., 1989).

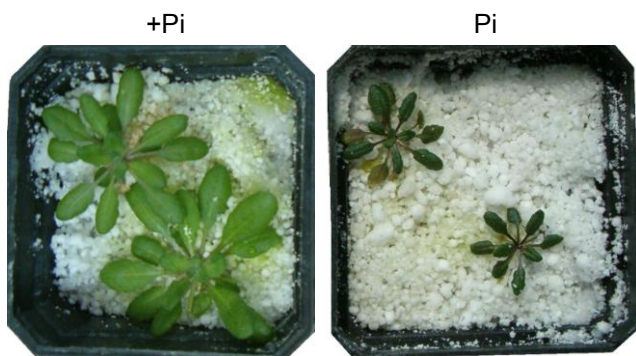


Figura 12. Plantas silvestres en deficiencia de Pi. Se muestran plantas creciendo en condiciones suficientes de fósforo (+P) y en deficiencia de fósforo (-Pi) a 10 días de tratamiento. Los síntomas visibles de la deficiencia de Pi incluyen tamaño pequeño de la roseta y coloración verde oscuro en hojas.

6.2.1 RT-PCR

Los niveles de expresión del gen *akin11* en plantas sometidas a suficiencia y deficiencia de Pi, se estudiaron a partir de su transcrito, mediante la técnica de RT-PCR.

Se amplificó por PCR, un fragmento del ADNc de *akin11*, de aproximadamente 393 pb, obtenido a partir de la transcripción reversa de plantas silvestres sometidas a los diferentes tratamientos. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar el ADNc de un control del efecto de deficiencia de Pi, el gen *At4*, de aproximadamente 427 pb. Como control interno se amplificó un segmento de 370 pb del gen de actina.

La región amplificada para el gen *akin11*, se encuentra comprendida entre el inicio del exón número 10 y el final del exón número 11 del gen (Figura 13), lo cual permitió descartar contaminación por amplificación de ADN genómico.

Los resultados del RT-PCR indicaron que no existe diferencia en la expresión de *akin11* en plantas crecidas en condiciones de suficiencia y de deficiencia de fósforo (figura 14).

En contraste, el gen *At4*, que es regulado positivamente por la deficiencia de fósforo, incrementó el nivel de su transcrito desde los 5 días de deficiencia. El gen de actina se transcribe constitutivamente, y, durante el tiempo de tratamiento en deficiencia de Pi mantuvo niveles constantes de transcrito, lo cual permitió trabajar bajo condiciones normalizadas de concentración de ARNm, con respecto a este control.

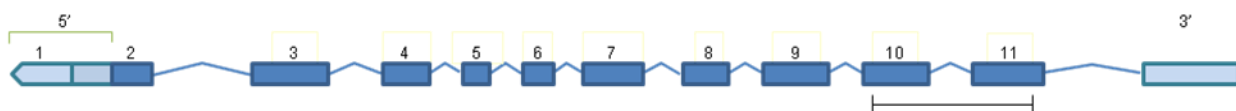


Figura 13. Diagrama del gen *akin11* en donde se muestra la región amplificada del ADNc de *akin11* mediante la técnica de RT-PCR. El fragmento amplificado del gen *akin11* mediante la reacción RT-PCR se encuentra entre el exón 10 y 11 del gen, indicado mediante el segmento de recta color negro. Las cajas numeradas indican los exones. Las cajas en color azul oscuro muestran las regiones codificantes y en las cajas color azul claro se indican las regiones 5' utr y 3' utr.

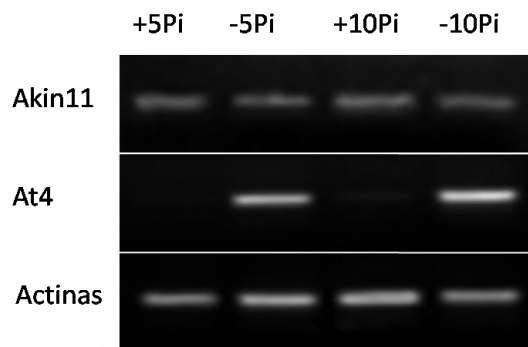


Figura 14. Expresión de *akin11* en deficiencia de Pi. RT-PCR para *akin11* (393pb), *At4* (427 pb) y actinas (370pb) a 5 (± 5 Pi) y 10 días (± 10 Pi) de tratamiento. Se puede observar que el nivel de expresión del gen *akin11* se mantiene constante durante los días analizados tanto para condiciones normales como deficientes de fosfato.

6.3 Producción de plantas que sobreexpresan *akin11*

Los resultados obtenidos por RT-PCR mostraron que los niveles de expresión del gen *akin11* no varían durante la deficiencia de Pi, al menos durante el periodo de estudio. Esto sugiere que el gen *akin11* se transcribe constitutivamente durante la deficiencia de Pi, y, que su regulación puede darse a otro nivel.

Para los estudios a nivel proteico del gen *akin11*, se generaron plantas transgénicas sobreexpresadoras de una proteína quimérica que consistía de AKIN11 fusionada hacia su extremo carboxilo terminal con la GFP. Lo cual permitió conocer la localización subcelular de la proteína AKIN11 y detectar el efecto que tiene la deficiencia de Pi en el contenido proteico del gen *akin11*.

En el laboratorio se contaba con una cepa de *Agrobacterium thumefaciens* transformada con un vector de expresión constitutivo (pEarlyGate 103) que contenía el ADNc de *akin11*. La descripción del T-ADN este vector se detalla en la figura 15.

Un cultivo de bacterias transformadas se utilizó para transfectar plantas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia, mediante el método de inmersión. Se obtuvieron doce plantas transformadas y sus semillas se colectaron individualmente.



Figura 15. T-ADN del vector de clonación. Esquema del T-ADN del vector utilizado en la transformación de *A. thaliana*. El ADNc de AKIN11 se fusionó río arriba de GFP en el vector pEarlyGate 103. BAR es el ADNc del gen *bar* cuya expresión permite resistencia al herbicida glufosinato de amonio. 35S es el promotor fuerte del virus del mosaico de la coliflor (CVM). GFP es el ADNc del gen *gfp*. 6xHis se refiere a una secuencia de ADN que codifica para una cola de 6 His (etiqueta de His). OCS es el extremo 3' del gen de sintasa octopina, que incluye una cola de poliadenilación y presuntuosas secuencias de terminación de la transcripción. *attR1* y *attR2* son los sitios de recombinación que permiten clonar en sentido DNA exógeno, que en nuestro caso fue el ADNc de *akin11*. LB y RB son las secuencias de los bordes izquierdo y derecho que transfieren T-ADN mediado por *A. thumefaciens* a la planta.

Para seleccionar a las plantas transgénicas, se sembraron semillas AKIN11-GFP en medio B5 sólido con una concentración de 300 μ M del herbicida glufosinato de amonio (figura 16). Las plantas transformadas pudieron crecer bajo estas condiciones, ya que el vector pEarlyGate 103 tiene el ADNc del gen *bar*, que codifica para una fosfonotricina acetiltransferasa la cual acetila el grupo libre NH_2 de la fosfonotricina (un potente inhibidor de la glutamina sintetasa), y, por tanto, previene de la toxicidad del glufosinato de amonio (Weigel y Glazebrook, 2002).

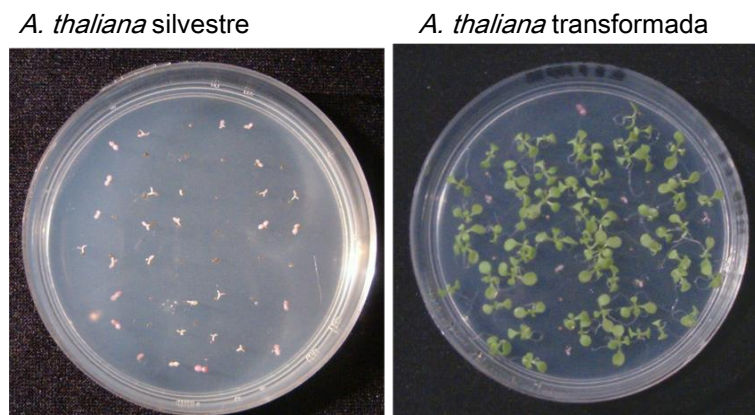


Figura 16. Selección de plantas transgénicas. Semillas de plantas silvestres e infectadas fueron crecidas en medio MS conteniendo el herbicida BASTA, sólo las plantas transformadas pudieron sobrevivir.

Las plantas que sobrevivieron se transfirieron a suelo, identificándolas según la línea de la cual provenían para obtención de semilla. Adicionalmente, se comprobó por PCR que las plantas resistentes al glufosinato de amonio, tuvieran el gen *akin11* fusionado con la GFP (Figura 17).

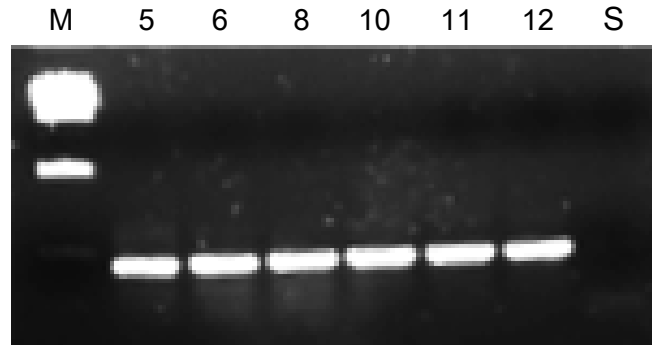


Figura 17. PCR para comprobación de transfección de Arabidopsis, mediante la amplificación de un fragmento de ADNc *akin11-gfp*. 5, 6, 8, 10, 11, 12 líneas de plantas transformadas. S, Silvestre. M, marcadores de peso molecular, fago lambda digerido con HindIII.

6.4 Localización celular de la proteína AKIN11

Se realizaron observaciones mediante microscopía confocal en cortes finos de hoja de plantas transgénicas para determinar la localización de la proteína de fusión AKIN11-GFP en condiciones normales de Pi. La figura 18 indica que en las líneas transgénicas AKIN11-GFP 12 y 6 la fluorescencia de GFP se asoció principalmente al cloroplasto. En las plantas transgénicas que sólo expresaban GFP, la fluorescencia se encuentra dispersa en toda la célula.

6.5 Expresión de la proteína AKIN11 en deficiencia de Pi

Durante los ensayos de estudio de la proteína AKIN11 se utilizaron plantas transgénicas que fueron sometidas a condiciones suficientes y deficientes de Pi. Todas las plantas presentaron los mismos síntomas de la deficiencia de Pi. Las hojas de las rosetas en deficiencia de Pi tomaron un color verde intenso que cambió a violáceo debido a la producción de antocianinas (Fredeen et al., 1989). Cabe mencionar que las plantas transgénicas no cambiaron su morfología con respecto a las plantas silvestres, crecidas en condiciones de suficiencia y deficiencia de fosfato (figura 19).

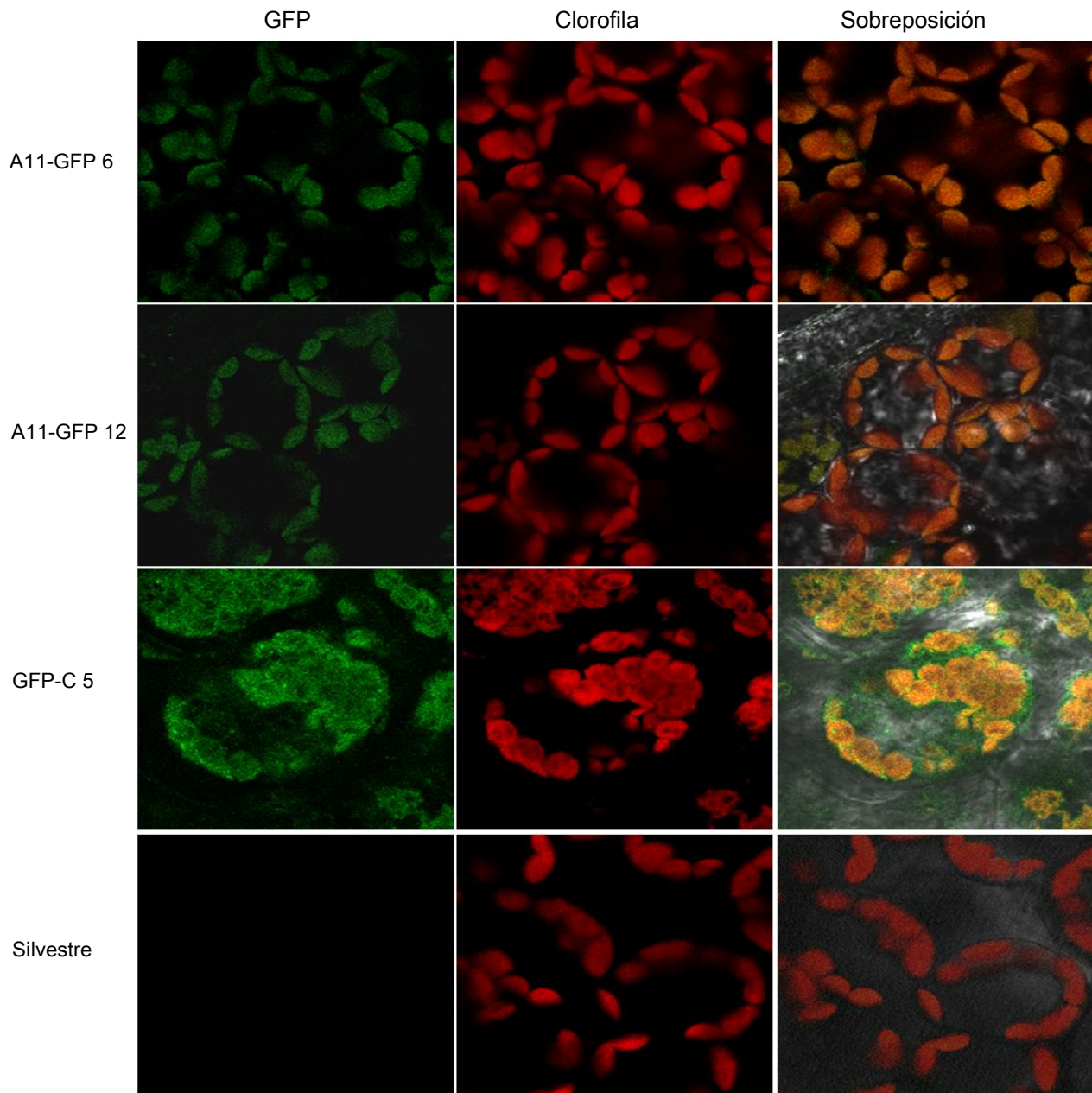


Figura 18. Fotografías de microscopía confocal de cortes de tejido de hoja de plantas creciendo en **condiciones normales de Pi**. La imagen muestra que la luz emitida por GFP colocaliza con la autofluorescencia de las plantas transgénicas (líneas 6 y 12) debida a la clorofila, en cloroplastos. GFP-CONTROL 5, indicó deslocalización de la proteína reportera y en la planta silvestre no se observó emisión de fluorescencia a 488 nm. La fluorescencia debida a la clorofila fue determinada con una λ excitación de 633 nm y su emisión registrada a 647 nm. GFP se excitó a 488 nm y su emisión registrada a 510 nm.

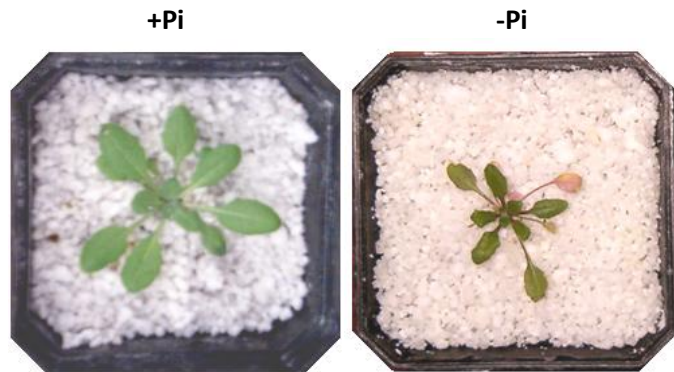


Figura 19. Plantas transgénicas en tratamiento de suficiencia y deficiencia de Pi. Todas las plantas durante la deficiencia de Pi mostraron el fenotipo característico del estrés, hojas color verde oscuro apagado que adquieren luego un color rojizo o púrpura característico y llegan a secarse.

6.5.1 Localización celular de la proteína AKIN11 en condiciones deficientes de Pi

En la figura 20, se muestran las comparaciones realizadas mediante microscopía confocal de cortes de hojas de plantas transgénicas crecidas en condiciones normales y deficientes de Pi. Se observó que la fluorescencia de la proteína GFP de las plantas AKIN11-GFP en deficiencia de Pi desaparece casi por completo.

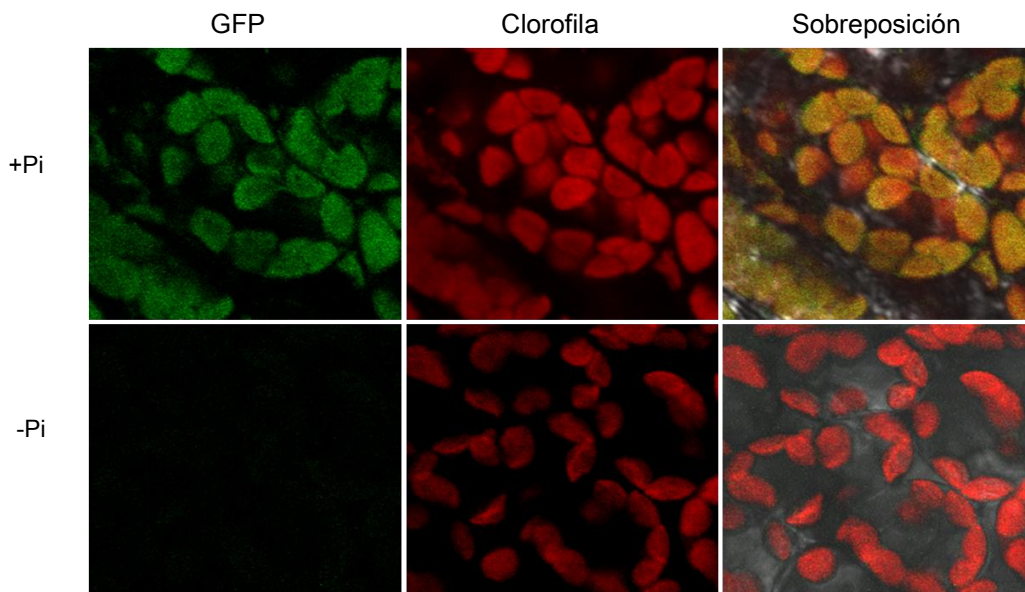


Figura 20. AKIN11-GFP en deficiencia de Pi. Fotografías de microscopía confocal de plantas transgénicas de la línea AKIN11-GFP 12 que crecieron en condiciones normales (+Pi) y deficientes de Pi (-Pi) durante 10 días de tratamiento. La fluorescencia debida a GFP disminuyó, en plantas sometidas a deficiencia de Pi. La fluorescencia debida a la clorofila se determinó con una λ excitación de 633 nm y su emisión registrada a 647 nm y GFP se excitó a 488 nm y su emisión registrada a 510 nm.

6.6 Determinación de la cantidad de AKIN11 por Western Blot

Para conocer si la desaparición de la fluorescencia de la proteína AKIN11-GFP correspondía a una disminución en su contenido proteico se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando las plantas transgénicas de la línea AKIN11-GFP12 crecidas en condiciones de suficiencia y deficiencia de Pi.

La proteína de fusión AKIN11-GFP se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-GFP y los complejos se separaron mediante SDS-PAGE. Las muestras proteicas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y la proteína se identificó utilizando anticuerpos contra GFP. El peso esperado de la proteína de fusión AKIN11-GFP es de aproximadamente 86 KDa. En los ensayos de Western Blot realizados, obtenemos el revelado de una banda correspondiente a una proteína de peso cercano a 90 KDa, puesto que utilizamos anticuerpos específicos contra GFP, suponemos que esta marca corresponde a la proteína de interés. También se muestra una banda de señal fuerte a 50 KDa, la cual corresponde a inmunoglobulinas (IgG) provenientes de los anticuerpos anti-GFP, esta banda sirve de control de cantidad de proteína revelada en cada muestra.

Los resultados del Western Blot, muestran que el contenido de la proteína AKIN11 en deficiencia de Pi disminuye respecto a las plantas crecidas en suficiencia de Pi (Figura 21). Cabe mencionar que los ensayos de western blot revelados contra anti-GFP se hicieron varias veces, tanto en extractos crudos, como con inmunoprecipitados de muestras de hoja de plantas crecidas en suficiencia y deficiencia de Pi. Invariablemente se obtuvieron los mismos resultados, una disminución de la intensidad en la banda correspondiente a AKIN11-GFP en condiciones deficientes de Pi respecto a las muestras de plantas crecidas en suficiencia de Pi. Debido a que los Western blot obtenidos con extractos totales mostraban revelados sucios se optó por la inmunoprecipitación.

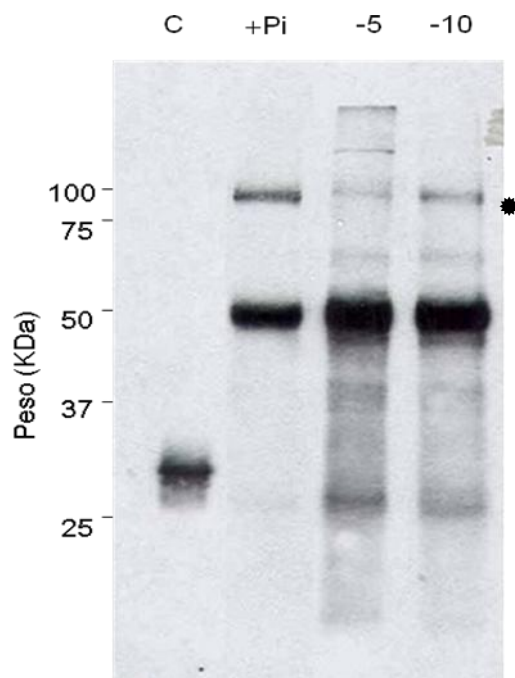


Figura 21. Western blot de inmunoprecipitados de proteína AKIN11-GFP provenientes de hoja de plantas transgénicas AKIN11-GFP 12. Para determinar cualitativamente la expresión de AKIN11 a 5 y 10 días de deficiencia Pi (-5, -10), se utilizaron anticuerpos específicos anti-GFP tanto para inmunoprecipitar la proteína como para revelar la membrana, la disminución de la proteína se observa desde los 5 días de tratamiento.

* AKIN11-GFP (90KDa), C GFP-CONTROL5, +Pi Condiciones de suficiencia de Pi.

6.7 Determinación de actividad cinasa SnRK1 en plantas transgénicas

La pregunta que surgió con los resultados anteriores fue ¿cómo afecta la disminución de la proteína AKIN11 a la actividad de cinasa del complejo SnRK1 en condiciones deficientes de Pi? Para responder a esto se determinó la actividad cinasa SnRK1 en plantas transgénicas GFP-CONTROL 5, AKIN11-GFP 6 y 12 sometidas a deficiencia de fósforo durante 10 días de tratamiento, mediante la fosforilación del péptido SAMS.

En condiciones de suficiencia de Pi, los niveles de actividad cinasa tipo SnRK1 en plantas transgénicas control y las que sobreexpresan AKIN11 fueron semejantes (figura 22).

Cuando las plantas crecieron en condiciones de deficiencia de Pi se observó el mismo efecto, una disminución de la actividad SnRK1 en todos los casos. La actividad cinasa del control

disminuyó 20% ($\pm 4.3\%$) con respecto al control en condiciones suficientes de Pi. En comparación, las plantas AKIN11-GFP tuvieron una disminución de actividad aún mayor del 36% ($\pm 2.7\%$) y 38% ($\pm 4.5\%$) para la línea 6 y 12 respectivamente (figura 22). Suponemos que la sobreexpresión de la proteína AKIN11-GFP, favoreció la formación de complejos SnRK1 catalíticamente activos teniendo a esta proteína como subunidad α . Por tanto, se sugiere que la disminución del contenido de AKIN11-GFP en deficiencia de Pi, correlacionó con la disminución de la actividad de cinasa SnRK1 en las plantas transgénicas.

Los resultados presentados en la figura 22, se realizaron por triplicado, tomando muestras de hojas de tres plantas diferentes según el tratamiento y línea transgénica. La determinación de la actividad cinasa SnRK1, en plantas transgénicas sometidas suficiencia y deficiencia de Pi, se realizó por triplicado, obteniendo en todas las ocasiones resultados semejantes.

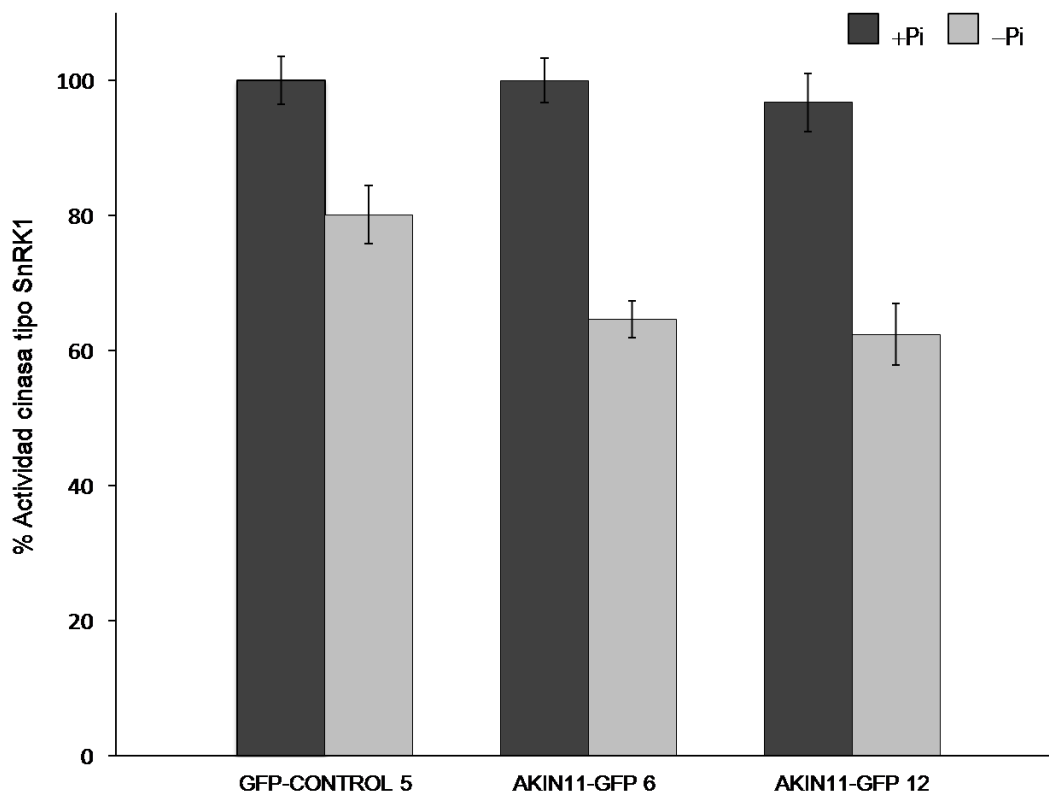


Figura 22. Gráfica de la actividad cinasa debida a SnRK1 en plantas transgénicas GFP-CONTROL 5, AKIN11-GFP6 y AKIN11-GFP12 sometidas a deficiencia de fosfato durante 10 días.

7. DISCUSIÓN

En la actualidad existen pocos estudios respecto a la transducción de señales que dirigen los procesos de respuesta a la deficiencia de Pi en plantas. En nuestro laboratorio se ha encontrado que en raíces de frijol la subunidad catalítica de una cinasa tipo SnRK1 aumenta su mensaje en deficiencia de Pi (Coello, datos no publicados). Además, que, en hojas de *Arabidopsis thaliana* la actividad cinasa correspondiente a SnRK1, disminuye durante la deficiencia de Pi (Fragoso et al., 2009). Ello sugiere que las SnRK1 se pueden regular a diferentes niveles, constituyendo un campo interesante y nuevo por investigar. Para conocer un poco más de la regulación de SnRK1, se obtuvo una mutante de *Arabidopsis* que tiene interrumpido el gen *akin10*, (Fragoso et al., 2009). La actividad cinasa debida a SnRK1 de plantas Δ *akin10* no se abate en condiciones suficientes y deficientes de Pi lo cual hizo suponer que la otra subunidad catalítica, AKIN11, también se encuentra activa y podría tener un papel importante en la fisiología de la planta.

El estudio de la expresión de los genes codificadores de las subunidades catalíticas (*akin10*, *akin11* y *akin12*) a lo largo de todas las etapas de desarrollo de la planta, se realizó mediante el uso de la base de microarreglos pública GENEVESTIGATOR. Se encontró que *akin11* es un gen constitutivo que mantiene el nivel de su mensaje constante, excepto en etapa de desarrollo de silicuas donde alcanza la mayor expresión. Como, *akin10* y *akin11* tienen patrones de expresión semejantes, nos hizo suponer que los productos de ambos genes podrían participar en la formación de complejos SnRK1 durante condiciones nutrimentales normales. Los niveles de expresión de *akin12* son muy bajos en condiciones normales de crecimiento y debido a que su producto es considerado una proteína hipotética (Bhalerao et al., 1999), la contribución de *akin12* a la formación de complejos heterotriméricos SnRK1, se consideró mínima.

Durante la deficiencia de Pi, los niveles del ARNm de *akin11* de hojas de plantas silvestres se mantuvieron constantes comparados con los de plantas que crecieron en condiciones de suficiencia, lo cual indica que *akin11* no es regulado a nivel transcripcional bajo este estrés nutrimental.

La proteína de AKIN11 se estudió mediante la generación de plantas que sobreexpresaban AKIN11 fusionada con GFP. Por medio de microscopía confocal se observó que la localización de la proteína AKIN11 es principalmente cloroplástica. Ya que SnRK1 es importante en la respuesta a cambios luz/obscuridad, en el crecimiento, y, en la síntesis y movilización de almidón (Thelander et al., 2004; Baena-González et al., 2007), se sugiere que AKIN11 puede tener un papel primordial en la regulación de proteínas tanto cloroplásticas como citoplásmicas. Farrás y colaboradores (2001), mostraron en *Arabidopsis*, que SnRK1 se encuentra asociada a las proteínas AKP1/ASK1, AtCUL1 y α 4-PADI, las cuales forman parte de la vía de degradación ubiquitina/proteasoma 26S. Como estas proteínas tienen localización nuclear, se infirió que SnRK1 también se encuentra en el núcleo, formando parte del proteasoma 26S (Farrás et al., 2001). Sin embargo, en observaciones de plantas transgénicas de AKIN10 y AKIN11 (fusionadas con GFP) y tiñendo el núcleo con DAPI no se observó alguna señal de las proteínas en este organelo (Coello, datos no publicados). En nuestro laboratorio se realizaron observaciones en hojas de *Arabidopsis*, mediante inmunolocalización, encontrándose que las subunidades β y γ 1 tienen localización cloroplástica (Coello, datos no publicados). Estos datos y los obtenidos en el presente trabajo sugieren que el complejo SnRK1 se localiza principalmente en el cloroplasto.

Durante la deficiencia de Pi, las plantas transgénicas presentaron una considerable disminución en el contenido de AKIN11-GFP, tal como lo muestran los resultados de microscopía confocal y Western blot, esta disminución afectó negativamente la actividad de la cinasa SnRK1 tal como se discutirá a continuación.

En condiciones suficientes de Pi (figura 22) las plantas transgénicas que sobreexpresan AKIN11 fusionada a GFP mantuvieron los mismos niveles de actividad que los controles, es decir, aunque se sobreexpresó AKIN11, suponemos que sólo se formaron los complejos heterotriméricos activos indispensables para satisfacer las necesidades de la planta, sugiriendo que SnRK1 al igual que sus homólogos en animales y levaduras (Halford y Hardie 1998) son enzimas altamente reguladas. En condiciones deficientes de Pi la actividad endógena SnRK1 de plantas CONTROL-GFP, disminuyó 20% (\pm 4.3) y en las plantas transgénicas que tienen favorecido el complejo SnRK1 con AKIN11 como su subunidad catalítica, esta disminución fue

mayor (36% \pm 2.7 y 38% \pm 4.5 para la línea 6 y 12 respectivamente). Lo cual indica que en condiciones normales de crecimiento, la planta forma complejos SnRK1 activos teniendo a AKIN11 como subunidad catalítica, y, que durante la deficiencia de fosfato la disminución del contenido de AKIN11, reduce significativamente la actividad cinasa debida a SnRK1. Cabe mencionar que a pesar de grandes esfuerzos realizados en el laboratorio no hemos podido obtener la mutante Δ *akin11*, por lo que especulamos que la enzima es muy importante durante el desarrollo y crecimiento de la planta.

La invariabilidad de los niveles del ARNm de *akin11* en plantas silvestres y la disminución del contenido proteico de AKIN11-GFP en plantas transgénicas, durante la deficiencia de Pi sugieren que el gen *akin11* se regula postranscripcionalmente.

Estudios recientes han demostrado que las plantas se regulan a nivel postranscripcional durante la deficiencia de Pi, un ejemplo de ello es la degradación del ARNm del gen *PHO2*, mediada por el microARN 399 (miR399). En plantas sometidas a deficiencia de Pi se induce fuertemente la síntesis del miR399, el cual tiene como objetivo reprimir la expresión de su blanco, el ARNm de una enzima E2 conjugante de ubiquitina (UBC24, *At2g33770*), codificada por el gen *PHO2*. La enzima UBC24 está involucrada en la subregulación de sistemas de toma y transporte de Pi tales como Pht1;8, Pht1;9, IPS/At4. (Doerner, 2008; Fujii et al., 2005; Chiou et al., 2006), de tal manera que su disminución incrementa la absorción de Pi (Bari et al., 2006). Otra respuesta de tipo postranscripcional en plantas, a la deficiencia de Pi, se encuentra en las modificaciones covalentes de las proteínas por sumoilación, proceso que se lleva a cabo en Arabidopsis por la enzimas E3 ligasa del péptido SUMO (small ubiquitin-like modifier) denominada AtZISI (Miura et al., 2005). Uno de los blancos de la proteína AtZISI, es el factor transcripcional PHR1, el cual es un activador de genes de respuesta a la deficiencia de Pi. La sumoilación de PHR1, controla positivamente la expresión de *AtIPS1* y *AtRNS1* (Miura et al., 2005).

La degradación proteica es otra estrategia de regulación postranscripcional que realiza la planta durante la deficiencia de Pi. En un análisis proteómico, de raíces de maíz creciendo en deficiencia de Pi, se mostró que algunas de las proteínas de la vía ubiquitina/proteasoma 26S incrementaron significativamente durante el estrés. Lo cual sugiere que bajo deficiencia de Pi, la

ruta de ubiquitina/proteasoma 26S tiene un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de las raíces de maíz (Li et al., 2007). En la presente investigación, el análisis de la actividad y de la cantidad de proteína, sugieren que existe degradación de AKIN11. Hasta el momento no hay ningún reporte que señale que la proteína AKIN11 esté regulada por degradación. Sin embargo, trabajos realizados con la subunidad catalítica AKIN10 muestran que la proteína puede ser ubiquitinada por el complejo PRL1-DDB1-CUL4-ROC1 (por **pleiotropic regulatory locus 1- Damaged DNA Binding 1- Cullin 4- Regulator of Cullins 1**) una E3 ligasa basada en culina 4, y, degradada *in vitro* por el proteasoma 26S (Manzano et al., 2008; Lee et al., 2008). En la ligasa E3, PRL1 funge como el receptor de AKIN10 (Lee et al., 2008). Debido a que PRL1 es un regulador negativo de SnRK1 y que se une tanto a AKIN10 como a AKIN11 (Bhalerao et al., 1999), se propone que esta última también es degradada, vía el proteasoma 26S. De manera interesante, en las condiciones de deficiencia de fósforo, solamente la subunidad catalítica AKIN11 es regulada negativamente, mientras que, la cantidad de AKIN10 permanece constante (Fragoso et al., 2009).

Esta investigación sugiere que la subunidad catalítica AKIN11 tiene funciones específicas dentro de la planta y que se regula postranscripcionalmente en respuesta a la deficiencia de Pi, pero deja algunas preguntas abiertas entre ellas ¿qué papel desarrolla AKIN11 en condiciones suficientes de Pi?, ¿cuál es el proceso específico de degradación de AKIN11 durante la deficiencia de Pi?, ¿qué implicaciones tiene en la planta la disminución de la actividad SnRK1 durante la deficiencia de Pi?, ¿cómo se moviliza *akin11* al cloroplasto?, ¿cómo selecciona la célula los complejos catalíticos SnRK1 activos? para dar respuesta a éstas y otras preguntas relacionadas, se requiere más investigación.

8. CONCLUSIONES

Akin11 es un gen constitutivo que no se regula a nivel transcripcional durante la deficiencia de Pi.

La proteína AKIN11 se localiza principalmente en cloroplasto.

La disminución de la actividad cinasa tipo SnRK1 en deficiencia de Pi es resultado de la regulación negativa postranscripcional de AKIN11.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akman HO, Sampayo JN, Ross FA, Scott JW, Wilson G, Benson L, Bruno C, Shanske S, Hardie DG, Dimauro S (2007) Fatal infantile cardiac glycogenosis with phosphorylase kinase deficiency and a mutation in the gamma2-subunit of AMP-activated protein kinase. *Pediatr. Res.* 62, 499-504.

Alderson A, Sabelli PA, Dickinson JR, Cole D, Richardson M, Kreis M, Shewry PR, Halford NG (1991) Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 8602-8605.

Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Liljenberg C y Sandelius AS (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett.* 537, 128-132.

Baena-González E y Sheen J (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci.* 13, 474-82.

Baena-González E, Rolland F, Thevelein JM, Sheen J (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature.* 448, 938-42.

Bari R, Datt Pant B, Stitt M, Scheible WR (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.* 141, 988-99.

Bernal L, Coello P, Martínez-Barajas E (2005) Possible role played by R1 protein in starch accumulation in bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings under phosphate deficiency. *J. Plant Physiol.* 162, 970-6.

Bhalerao RP, Salchert K, Bakó L, Okrészl L, Sábados L, Muranaka T, Machida Y, Schell J, Koncz C (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 5322-5327.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-54.

Camacho Y, Martínez-Castilla L, Fragoso S, Vázquez S, Martínez-Barajas E, Coello P (2008) Characterization of a type A response regulator in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in response to phosphate starvation. *Physiol. Plant.* 132, 272-82.

Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF, Su CL (2006) Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18, 412–421.

Ciereszko I, Johansson H, Hurry V, Kleczkowski LA (2001) Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of *Arabidopsis*. *Planta.* 212, 598–605.

Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski LA (2005) Interactive effects of phosphate deficiency, sucrose and light/dark conditions on gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 162, 343-53.

Coello P (2002) Purification and characterization of secreted acid phosphatases in phosphorus-deficient *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant.* 116, 293-298.

Crute BE, Seefeld K, Gamble J, Kemp BE, Witters LA (1998) Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 35347-54.

Davies SP, Carling D, Hardie DG (1989) Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *Eur. J. Biochem.* 186, 123-128.

Doerner P (2008) Phosphate starvation signaling: a threesome controls systemic P(i) homeostasis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 536-40.

Dörmann P y Benning C (2002) Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci.* 7, 112–118.

Farrás R, Ferrando A, Jásik J, Kleinow T, Okrészl L, Tiburcio A, Salchert K, del Pozo C, Schell J, Koncz C (2001) SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J.* 20, 2742–2756.

Ferrando A, Koncz-Kálmán Z, Farrás R, Tiburcio A, Schell J, Koncz C (2001) Detection of in vivo protein interactions between Snf1-related kinase subunits with intron-tagged epitope-labelling in plant cells. *Nucleic Acids Res.* 29, 3685–3693.

Fragoso S, Espindola L, Paez-Valencia J, Gamboa A, Camacho Y, Martinez-Barajas E, Coello P (2009) SnRK1 isoforms, AKIN10 and AKIN11, are differentially regulated in Arabidopsis plants under phosphate starvation. *Plant Physiol. Preview*. DOI:10.1104/pp.108.133298.

Franco-Zorrilla JM, Gonzalez E, Bustos R, Linhares F, Leyva A, Paz-Ares J (2004) The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J. Exp. Bot.* 55, 285–293.

Fredeen AL, Rao IM, Terry N (1989) Influence of Phosphorus Nutrition on Growth and Carbon Partitioning in Glycine max. *Plant Physiol.* 89, 225-230.

Fujii H, Chiou TJ, Lin SI, Aung K, Zhu JK (2005) A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 15, 2038-43.

Gissot L, Polge C, Bouly JP, Lemaitre T, Kreis M, Thomas M (2004) AKINb3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic beta-subunits. *Plant Mol. Biol.* 56, 747–759.

Gissot L, Polge C, Jossier M, Girin T, Bouly JP, Kreis M, Thomas M (2006) AKINbetagamma contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiol.* 142, 931-44.

Guo B, Jin Y, Wussler C, Blancaflor EB, Motes CM, Versaw WK (2008) Functional analysis of the Arabidopsis PHT4 family of intracellular phosphate transporters. *New Phytol.* 177, 889-98.

Halford NG, Bouly JP, Thomas M (2000) SNF1-related protein kinases (SnRKs): regulators at the heart of the control of carbon metabolism and partitioning. *Adv. Bot. Res.* 32, 405–434.

Halford NG, Hardie DG (1998) SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol. Biol.* 37, 735-748.

Halford NG, Hey S, Jhurreea D, Laurie S, McKibbin R, Matthew JP, Zhang Y (2003) Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.* 54, 467-475.

Halford NG, Hey S, Jhurreea D, Laurie S, McKibbin RS, Matthew JP, Zhang Y (2004) Highly conserved protein kinases involved in the regulation of carbon and amino acid metabolism. *J. Exp. Bot.* 55, 35-42.

Hamburger D, Rezzonico E, MacDonald-Comber Petétot J, Somerville C, Poirier Y (2002) Identification and characterization of the Arabidopsis PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell.* 14, 889-902.

Hao L, Wang H, Sunter G, Bisaro DM (2003) Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell*. 15, 1034-48.

Hardie DG (2004) The AMP-activated protein kinase pathway-new players upstream and downstream. *J. Cell Sci*. 117, 5479-87.

Hardie DG (2007a) AMPK and SNF1: Snuffing Out Stress. *Cell Metab*. 6, 339-40.

Hardie DG (2007b) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 8, 774-85.

Hardie DG, Carling D, Carlson M (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem*. 67, 821-55. Review.

Hardie DG, Hawley SA, Scott JW (2006) AMP-activated protein kinase-development of the energy sensor concept. *J. Physiol*. 1, 7-15.

Hardie DG, Sakamoto K (2006) AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda)* 21, 48-60.

Hardie DG, Salt IP, Davies SP (2000). Analysis of the role of the AMP-activated protein kinase in the response to cellular stress. *Methods Mol. Biol*. 99, 63-74.

Harthill JE, Meek SE, Morrice N, Peggie MW, Borch J, Wong BH, Mackintosh C (2006) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J*. 47, 211-23.

Hedbacker K, Carlson M (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front. Biosci*. 1, 2408-2420

Hey S, Mayerhofer H, Halford NG, Dickinson JR (2007) DNA sequences from Arabidopsis, which encode protein kinases and function as upstream regulators of Snf1 in yeast. *J. Biol. Chem*. 282, 10472-10479.

Hinsinger P (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil*. 237, 173-195.

Holford I CR (1997) Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Aust. J. Soil Res*. 35, 227-239.

Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR, Thomas M, Walker-Simmons K, Zhu JK, Harmon AC (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*. 132, 666-680.

Hudson, E.R. Pan DA, James J, Lucocq JM, Hawley SA, Green KA, Baba O, Terashima T, Iseli TJ, Walter M, van Denderen BJ, Katsis F, Witters LA, Kemp BE, Michell BJ, Stapleton D (2005) AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270). *J. Biol. Chem.* 280, 13395-13400.

Jouhet J, Maréchal E, Baldan B, Bligny R, Joyard J, Block MA (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J. Cell Biol.* 167, 863-74.

Jungk A (2001) Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 164, 121–129.

Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Jain A, Held MA, Carpita NC, Raghothama KG (2007) Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in Arabidopsis. *Planta.* 225, 907-918.

Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, Michell BJ, Chen ZP, Witters LA (1999) Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem. Sci.* 24, 22-25.

Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, Chen ZP, Murthy S, Walter M, Gupta A, Adams JJ, Katsis F, van Denderen B, Jennings IG, Iseli T, Michell BJ, Witters LA (2003) AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 162-168.

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.

Kobayashi K, Masuda T, Takamiya K-i, Ohta H (2006) Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk. *Plant J.* 47, 238–248.

Kolbe A, Tiessen A, Schluempmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberger P (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 11118–11123

Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685.

Laurie S, McKibbin RS, Halford NG (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.

Lee JH, Terzaghi W, Gusmaroli G, Charron JB, Yoon HJ, Chen H, He YJ, Xiong Y, Deng XW (2008) Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant cell.* 20,152-67.

Liu J, Ishitani M, Halfer U, Kim CS, Zhu JK (2000) The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 3730-3734.

Logemann E, Birkenbihl RP, Ulker B, Somssich IE (2006) An improved method for preparing Agrobacterium cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol. *Plant Methods.* 2, 16.

López-Bucio J, Hernandez-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Nieto-Jacobo M F, Simpson J, Herrera-Estrella L (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. *Plant Physiol.* 129, 244–256.

Lovas A, Sós-Hegedus A, Bimbó A, Bánfalvi Z (2003) Functional diversity of potato SNF1-related kinases tested in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 321, 123-9.

Lumbreras V, Alba MM, Kleinow T, Koncz C, Pagès M (2001) Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Rep.* 2, 55–60.

Manzano C, Abraham Z, López-Torrejón G, Del Pozo JC (2008) Identification of ubiquitinated proteins in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 68, 145-58.

Milan D, Jeon JT, Looft C, Amarger V, Robic A, Thelander M, Rogel-Gaillard C, Paul S, Iannuccelli N, Rask L, Ronne H, Lundström K, Reinsch N, Gellin J, Kalm E, Roy PL, Chardon P, Andersson L (2000) A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science.* 288, 1248-1251.

Misson J, Raghothama KG, Jain A, Jouhet J, Block MA, Bligny R, Ortet P, Creff A, Somerville S, Rolland N, Doumas P, Nacry P, Herrera-Estrella L, Nussaume L, Thibaud MC (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 11934–11939.

Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, Baek D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, Yun DJ, Hasegawa PM (2005) The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 7760–7765.

Müller R, Morant M, Jarmer H, Nilsson L, Nielsen TH (2007) Genome-wide analysis of the Arabidopsis leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiol.* 143, 156-71.

Parra C, Martínez-Barajas E, Acosta J y Coello P (2004) Respuesta a la deficiencia de fosfato de genotipos de frijol contrastantes en su capacidad de crecer en suelos con bajo contenido de fósforo. *Agrociencia.* 38, 131-139.

Pierre M, Traverso JA, Boisson B, Domenichini S, Bouchez D, Giglione C, Meinel T (2007) N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in Arabidopsis. *Plant Cell.* 19, 2804-2821.

Plaxton WC (2004) Plant Response to Stress: Biochemical Adaptations to Phosphate Deficiency. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. Edit. Goodman R M. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 976–980.

Plaxton WC (2006) Metabolic Flexibility Helps Plants to Survive Stress. In *Plant Physiology*. Edit. Taiz L, Zeiger E. 4a. ed. <http://4e.plantphys.net/article.php?ch=e&id=124>

Poirier Y, Bucher M (2002) Phosphate transport and homeostasis in Arabidopsis. In *The Arabidopsis Book*. Edit. C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz doi/10.1199/tab.0099, <http://www.aspb.org/publications/Arabidopsis/>.

Poirier Y, Thoma S, Somerville C, Schiefelbein J (1991) Mutant of Arabidopsis deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol.* 3, 1087-1093.

Polekhina G, Gupta A, Michell BJ, van Denderen B, Murthy S, Feil SC, Jennings IG, Campbell DJ, Witters LA, Parker MW, Kemp BE, Stapleton D (2003) AMPK β -subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr. Biol.* 13, 867–8713.

Polge C, Thomas M (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.* 12, 20–28.

Raghothama K (2000) Phosphate transport and signaling. *Current Opinion in Plant Biology.* 3, 182-187.

Raghothama K, Karthikeyan A (2005) Phosphate acquisition. *Plant soil.* 274, 37-49.

Rao and Terry (1995) Leaf Phosphate Status, Photosynthesis, and Carbon Partitioning in Sugar Beet (IV. Changes with Time Following Increased Supply of Phosphate to Low-Phosphate Plants). *Plant Physiol.* 107, 1313-1321.

Rengel Z (2002) Genetic control of root exudation. *Plant and Soil.* 245, 59-70

Rengel Z, Marschner P (2005) Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytol.* 168, 305-12.

Rolland F, Baena-González E, Sheen J (2006) Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 675-709.

Rubio V, Linhares F, Solano R, Mratm A C, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15, 2122–2133.

Ruderman NB, Keller C, Richard AM, Saha AK, Luo Z, Xiang X, Giralto M, Ritov VB, Menshikova EV, Kelley DE, Hidalgo J, Pedersen BK, Kelly M. (2006) Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 55 Suppl. 2, S48-S54.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Gutiérrez-Ortega A, Hernández-Abreu E, Herrera-Estrella L (2006) Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of Arabidopsis to phosphorus deficiency. *Plant Physiol.* 140, 879-89.

Schachtman D P, Reid R J, Ayling S M (1998) Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiol.* 116, 447-453.

Schwachtje J, Minchin PE, Jahnke S, van Dongen JT, Schittko U, Baldwin IT (2006) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 12935-12940.

Scott JW, Hawley SA, Green KA, Anis M, Stewart G, Scullion GA, Norman DG, Hardie DG (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J. Clin. Invest.* 113, 274–284.

Shin HS, Dewbre GR y Harrison MJ (2004) Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low-and high-phosphate environments. *Plant J.* 39, 629–642.

Slocombe SP, Laurie S, Bertini L, Beaudoin F, Dickinson JR, Halford NG (2002) Identification of SnIP1, a novel protein that interacts with SNF1-related protein kinase (SnRK1). *Plant Mol. Biol.* 49, 31–44.

Stitt M (1998) Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: An enigmatic alternative to ATP. *Bot. Acta.* 111, 167–175.

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

Ticconi CA, Abel S (2004) Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *TRENDS in Plant Sci.* 9, 548-555.

Versaw WK y Harrison MJ (2002) A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell.* 14, 1751–1766.

Wang Y, Ribot C, Rezzonico E, Poirier Y (2004) Structure and Expression Profile of the Arabidopsis *PHO1* Gene Family Indicates a Broad Role in Inorganic Phosphate Homeostasis. *Plant Physiol.* 135, 1–12.

Weigel D, Glazebrook J (2002) Arabidopsis, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. Press. USA. 132-135.

Wu P, Ma L, Hou X, Wang M, WuY, Liu F, Deng XW (2003) Phosphate starvation triggers distinct alterations of genoma expression in Arabidopsis roots and leaves. *Plant Physiol.* 132, 1260-1271.

Young ET, Dombek KM, Tachibana C, Ideker T (2003) Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J. Biol. Chem.* 278, 26146-58.

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

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) W. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Anal