



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización del Dominio de Unión a Almidón
(SBD) presente en la subunidad reguladora AKIN β 2
del complejo SnRK1 de *Arabidopsis thaliana***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

Ana Karen Ruiz Gayosso



México D.F., 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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: **Profesor:** Dr. J. Eleazar Martínez Barajas

VOCAL: **Profesor:** Dra. Gloria Gutiérrez Venegas

SECRETARIO: **Profesor:** Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

2° SUPLENTE: **Profesor:** Dra. Aurora Lara Núñez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 105. Conjunto E. Departamento de Bioquímica. Facultad de Química.
Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Beatriz Alejandra Ávila Castañeda

SUSTENTANTE:

Ana Karen Ruiz Gayosso

AGRADECIMIENTOS

Agradezco esta tesis a la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha brindado grandes oportunidades tanto académicas como personales.

A mis padres quiero dar un reconocimiento especial porque ahora su esfuerzo y dedicación se ve reflejado en este trabajo. A mi mamá, que siempre se preocupa por mí y me enseñó a ocuparme de mi misma, por su duro esfuerzo para educarme. A mi papá porque aunque me discute muchas cosas, siempre me ha apoyado en todas las decisiones que he tomado y nunca me ha dejado sola. A mi hermano Alberto, no le agradezco más bien le dedico ésta tesis esperando que un día, yo logre ser un ejemplo para él.

También comparto este trabajo con mis compañeros, que siempre fueron amigos en quienes pude apoyarme durante gran parte de mi estancia en el laboratorio. Gracias a Daniel porque aún ahora después de su partida, sigo recordándolo con mucho cariño. A Ricardo que hace los días en el laboratorio sumamente divertidos y porque es el mejor equipo que me pudo tocar para emprender ésta y otras aventuras.

De manera muy importante, le agradezco infinitamente a Alejandra, por enseñarme casi todas las técnicas que desarrollé en este trabajo y por intentar guiarme no sólo en el laboratorio sino también en la vida, porque no deja que salga lo malo de mí, pero me alienta a seguir adelante. Le agradezco a la Dra. Patricia Coello por su apoyo y confianza, por ser un ejemplo a seguir y sobretodo por presionarme para terminar con los trámites.

Quiero que mis compañeros de la Facultad sean partícipes de este momento, porque formaron parte de una etapa muy importante en mi vida, por eso agradezco a Isabel, Malu y Javier. A Edgar y Ana María porque formamos parte del mejor equipo, por las fiestas, las risas y los buenos recuerdos.

Le dedico mi trabajo Luis, quien es un verdadero compañero y nunca me ha soltado la mano. Gracias Luis, por estar conmigo durante este tiempo, por el apoyo y la ayuda para lograr mis sueños, porque los hiciste tuyos.



ÍNDICE

I. RESUMEN	6
II. INTRODUCCIÓN	7
1. Estrés energético y señalización	7
2. La familia SNF1/AMPK/SnRK1	9
3. Estructura del complejo SnRK1	12
4. Regulación de la actividad de las cinasas SNF1/AMPK/SnRK1	14
5. SBD/GBD de las subunidades β	16
6. El almidón	20
III. ANTECEDENTES INMEDIATOS	22
IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVOS	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	25
VII. RESULTADOS	33
1. Verificación del plásmido pET101 β 2	33
2. Obtención de la proteína recombinante AKIN β 2	37
3. Evaluación de la capacidad de unión a almidón de la subunidad AKIN β 2	39
4. Localización subcelular de la subunidad AKIN β 2	41
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
IX. CONCLUSIONES	46
X. PERSPECTIVAS	47
XI. ANEXO	49
X. BIBLIOGRAFÍA	52



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrés y deficiencia energética	7
Figura 2. Respuestas mediadas por las SnRK1 frente al estrés	9
Figura 3. Estructura de las subunidades que conforman el complejo SnRK1 en <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
Figura 4. Regulación del complejo SnRK1	15
Figura 5. Estructura tridimensional del β -GBD de <i>R. norvegicus</i>	17
Figura 6. Alineamiento de las secuencias del SBD de <i>A. thaliana</i> y el β -GBD de rata	18
Figura 7. Predicción de la estructura tridimensional de la subunidad AKIN β 2	18
Figura 8. Composición del gránulo de almidón	20
Figura 9. Unión de la subunidad AKIN β γ con el almidón	21
Figura 10. Mapa del plásmido pET101 β 2	32
Figura 11. Ensayo de restricción de la construcción pET101 β 2	33
Figura 12. Amplificación del cDNA de la subunidad AKIN β 2	34
Figura 13. Alineamiento de la secuencia del cDNA de la subunidad AKIN β 2 con la reportada en TAIR	35
Figura 14. Sobreexpresión de la subunidad AKIN β 2	36
Figura 15. Purificación de la subunidad AKIN β 2	37
Figura 16. Ensayos de unión al almidón dependientes del pH	38
Figura 17. Ensayos de unión a almidón proveniente de diferentes fuentes vegetales	39
Figura 18. Detección de la subunidad AKIN β 2 en extractos crudos de plantas	40
Figura 19. Localización subcelular de la subunidad AKIN β 2 en hojas de <i>A. thaliana</i>	41



I. RESUMEN

El complejo SnRK1 tiene una participación muy importante en la regulación del balance energético y metabólico. Esta familia de proteínas con actividad de cinasa, altamente conservada en eucariontes, existe en forma de complejos heterotriméricos que comprenden una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras β y γ . Estructuralmente, las subunidades reguladoras β contienen un dominio denominado GBD (Glycogen Binding Domain en animales y SBD, Starch Binding Domain en plantas). Este dominio, presente también en las subunidades β de mamíferos, provoca la asociación del complejo con la molécula de glucógeno. En *Arabidopsis thaliana* existen dos isoformas de la subunidad β , AKIN β 1 y AKIN β 2 que conservan el SBD aunque no existe información sobre su asociación con la molécula de almidón.

En los resultados del presente trabajo se demostró que la subunidad AKIN β 2 se une *in vitro* a gránulos de almidón, aunque es dependiente del pH del medio, es decir la unión disminuye cuando el pH se torna básico. La interacción también se evaluó empleando gránulos de almidón extraídos de diferentes fuentes vegetales y una mezcla comercial de amilosa-amilopectina, donde se comprobó que la unión se realiza con diferente afinidad, dependiendo del grado de ramificación del polisacárido.

Adicionalmente, como primer acercamiento para esclarecer su importancia fisiológica, y debido a que la función del complejo está relacionada con su localización subcelular, se determinó mediante ensayos inmunohistoquímicos que la subunidad AKIN β 2 no tiene acceso al almidón almacenado en el interior de los cloroplastos, ya que se localizó mayoritariamente en el citoplasma de las células de hoja de *A. thaliana*. La comprobación bioquímica de estos resultados se realizó con la extracción de cloroplastos y la identificación con un anticuerpo específico de la subunidad AKIN β 2, donde se pudo determinar que la proteína se localiza asociada a la membrana externa de los cloroplastos.

En conjunto, estos resultados demuestran la interacción *in vitro* entre la subunidad AKIN β 2 con los gránulos de almidón, aunque esta subunidad reguladora no tiene acceso al almidón almacenado en el interior de los cloroplastos.



II. INTRODUCCIÓN

1. Estrés energético y señalización

Todos los seres vivos que habitan la Tierra se han adaptado a diversos ambientes en los que pueden crecer y desarrollarse. Si alguna de estas condiciones cambia o se modifica, los organismos deben hacerle frente con modificaciones fisiológicas, metabólicas o moleculares que eviten cualquier alteración en su crecimiento, desarrollo y longevidad. Es por esta razón que mantener la homeostasis metabólica y energética es una necesidad primordial pero también un reto para cualquier organismo. Las variaciones en el estado energético son inherentes a la vida. En especial las plantas, debido a su condición de organismos sésiles, detectan variaciones en las condiciones medioambientales y generan respuestas rápidamente que les permiten continuar con su desarrollo (Baena-González & Sheen, 2008).

Fluctuaciones en algunas condiciones como la disminución de la tasa fotosintética o respiratoria, alteraciones en el ciclo normal día-noche, periodos prolongados de oscuridad e inanición de nutrientes están comúnmente relacionados con estrés. Las consecuencias de estos cambios incluyen el cese inmediato del crecimiento normal, la activación de rutas catabólicas para abastecer con nutrientes, metabolitos o fuentes de energía alternativa a las células y un decaimiento en la actividad biosintética con la finalidad de conservar energía (Baena-González, Rolland, Thevelein, & Sheen, 2007). Lo anterior sugiere que múltiples tipos de estrés conducen a cambios en los niveles energéticos y a respuestas celulares para mantener la homeostasis. Datos experimentales indican que estas respuestas se dan a través de la reprogramación transcripcional. Inicialmente, la información obtenida, produjo la idea de que muchas de estas respuestas se generaban a partir de la expresión de unos cuantos genes que se inducían en ausencia de azúcares o periodos prolongados de oscuridad. Actualmente se conoce que la reprogramación transcripcional involucra miles de genes que se expresan o reprimen independientemente del estrés y que generan respuestas específicas (Baena-González et al., 2007).

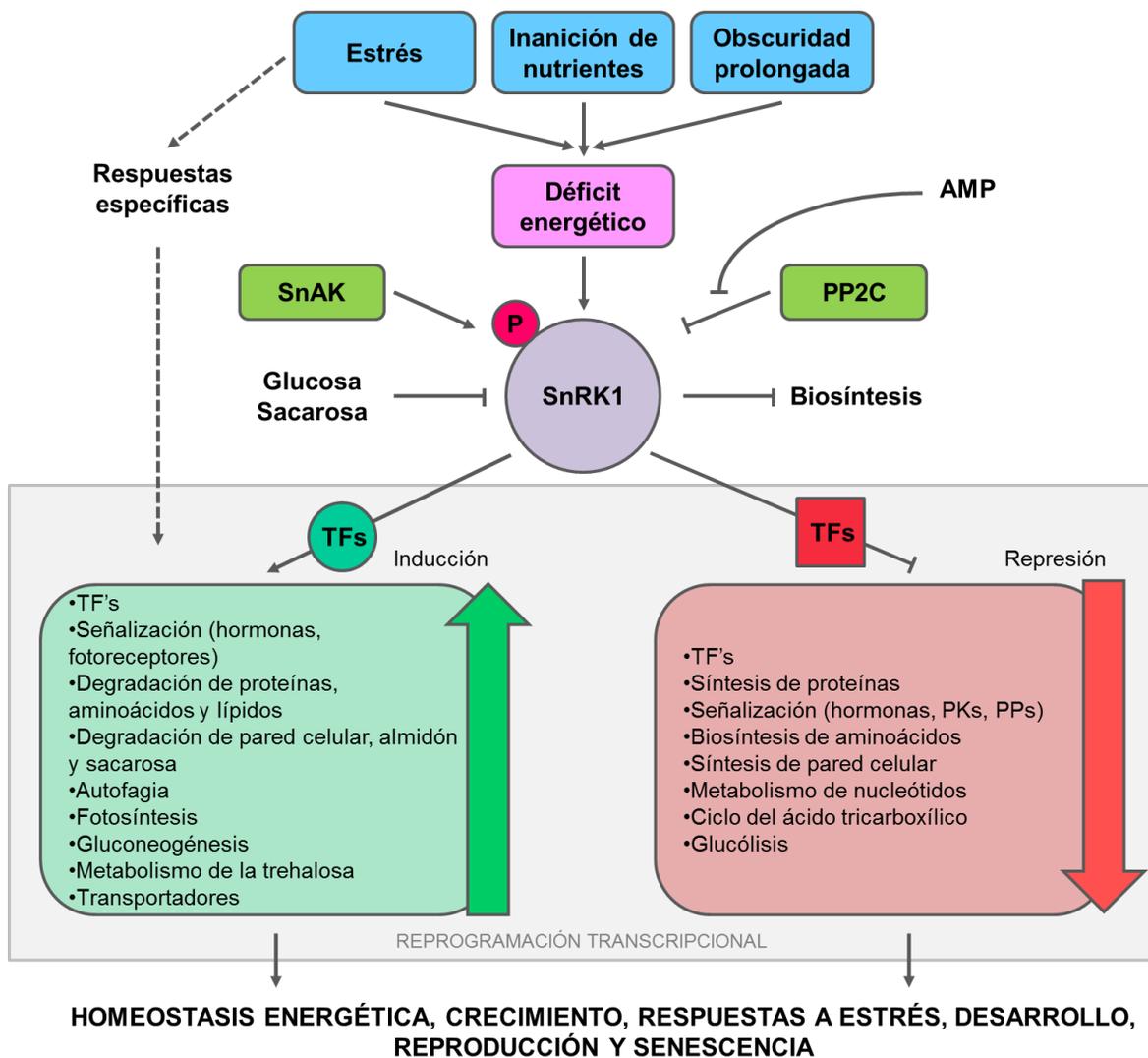


Figura 1. Estrés y deficiencia energética. Estados ambientales como periodos de oscuridad prolongada o la inanición de nutrientes así como otros tipos de estrés están relacionados con la deficiencia energética. Las plantas, como mecanismo para controlar este déficit desarrollaron el complejo heterotrimérico SnRK1 que realiza la reprogramación de la transcripción de genes que se reprimen o inducen bajo condiciones de estrés. (Tomado de Baena-González et al., 2008).

Coordinando esta reprogramación génica, se encuentra un complejo enzimático con actividad de cinasa denominado SnRK1 (Sucrose non-fermenting related kinase 1), que regula específicamente factores de transcripción (Figura 1). Además de esta actividad, muchos procesos metabólicos son controlados a través de la fosforilación e inhibición de enzimas metabólicas.



2. La familia SNF1/AMPK/SnRK1

Las proteínas cinasas SnRK1 de plantas son consideradas reguladores globales que controlan procesos para conservar energía y para la movilización de reservas (Ghillebert et al., 2011). Forma parte de una familia de proteínas altamente conservada en eucariontes en la que se incluye también a las SNF1 (Sucrose non-fermenting 1) de levaduras y las AMPK (AMP-activated kinase) de mamíferos.

En *Saccharomyces cerevisiae*, el gen de la proteína SNF1 fue descubierto gracias a una serie de mutaciones que imposibilitaban el crecimiento celular en sacarosa o fuentes de carbono no fermentables, razón de su nombre en inglés (sucrose non-fermenting). Esta proteína, es necesaria para la adaptación a medios de crecimiento con limitación de glucosa, provocando que las células sean capaces de metabolizar fuentes alternativas de carbono como sacarosa, etanol y glicerol (Celenza & Carlson, 1986).

El ortólogo en mamíferos es la AMPK. Este complejo proteínico originalmente fue identificado como una proteína cinasa que era activada alostéricamente por AMP y fosforilaba enzimas relacionadas con la síntesis de lípidos (Hardie, 2007). Es considerada el centro de control metabólico ya que se activa bajo condiciones que incrementan el índice AMP:ATP, incluyendo deficiencia de glucosa, inanición de nutrimentos, hipoxia, estrés oxidativo y actividad física extenuante. Una vez activa, la proteína implementa un sistema de ahorro energético a través de la regulación directa de enzimas involucradas en procesos catabólicos que permitan obtener energía como la glucólisis y la β -oxidación, mientras que limita los procesos biosintéticos, que requieren energía, como la síntesis de proteínas, esteroides y ácidos grasos (Hardie, 2007; Steinberg & Kemp, 2009). La AMPK es muy importante en la regulación de procesos metabólicos que permitan obtener energía en forma de ATP. Bajo condiciones normales de crecimiento el consumo de ATP es alto pero los procesos catabólicos mantienen los niveles de ATP:ADP y en consecuencia el índice AMP:ATP tiene un valor bajo. Cuando las células se encuentran bajo condiciones metabólicamente estresantes, el consumo de ATP se acelera y en consecuencia el índice de AMP:ATP aumenta activando a la AMPK.

En plantas, las SnRK1 comparten características funcionales y estructurales con sus homólogos SNF1 y AMPK. Estas cinasas actúan como un regulador energético del metabolismo en plantas, ayudando a controlar procesos de conservación de energía y



movilización de reservas (almidón, sacarosa y componentes de la pared celular) (Ghillebert et al., 2011). La primera evidencia de la conservación y regulación del metabolismo por parte de las SnRK1 surgió a partir de ensayos de complementación en una mutante de levadura *snf1Δ* con el cDNA de la SnRK1. Dicha complementación restableció la utilización de fuentes alternativas de carbono, indicando que la cinasa de plantas puede sustituir a la SNF1 en la cascada de señalización que permite la expresión de genes para la utilización de fuentes alternas de carbono (Alderson et al., 1991).

Las SnRK1 regulan el metabolismo y la expresión genética, al igual que su ortólogo en mamíferos, en respuesta al déficit energético. Los complejos SnRK1 controlan el metabolismo de carbohidratos debido a que modula la reprogramación transcripcional de genes importantes (Figura 2) como el de la sacarosa sintasa que participa en la degradación de la sacarosa y la α -amilasa, enzima clave para la degradación del almidón (Polge & Thomas, 2007). El complejo SnRK1, cuando está activo, induce la expresión de genes involucrados en procesos catabólicos de proteínas, lípidos y aminoácidos así como de la pared celular y el almidón (Figura 1). Interesantemente también induce la expresión de genes que participan en procesos de autofagia como son *APG/ATG*. De manera muy importante, además del control en los niveles de trehalosa-6-fosfato (T6P) a través de la regulación enzimática, el complejo SnRK1 también induce la expresión de los genes *TPS8-11*, involucrados en el metabolismo de la trehalosa y que modifican y censan los niveles de T6P en la célula (Baena-González et al., 2007). Además de la inducción de genes, el complejo SnRK1 también reprime los niveles de expresión de ciertos genes como aquellos involucrados en la biogénesis de ribosomas y del anabolismo (Figura 1).

Como regulador enzimático, las SnRK1 están involucradas en el control del metabolismo del carbono a través de la modulación por fosforilación directa de la actividad enzimática o la activación redox de enzimas (Halford & Hey, 2009). Hasta el momento han sido reconocidas algunas proteínas como blancos de la SnRK1, entre ellas se pueden mencionar a la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) que participa en la síntesis de esteroides, la sacarosa fosfato sintasa (SPS) que se relaciona con la síntesis de sacarosa, la nitrato reductasa (NR) involucrada en la asimilación de nitrógeno y la trehalosa-fosfato sintasa (TPS) encargada de la síntesis de la trehalosa-6-P (T6P) que es un metabolito importante en la señalización (Coello, Hey, & Halford, 2011).

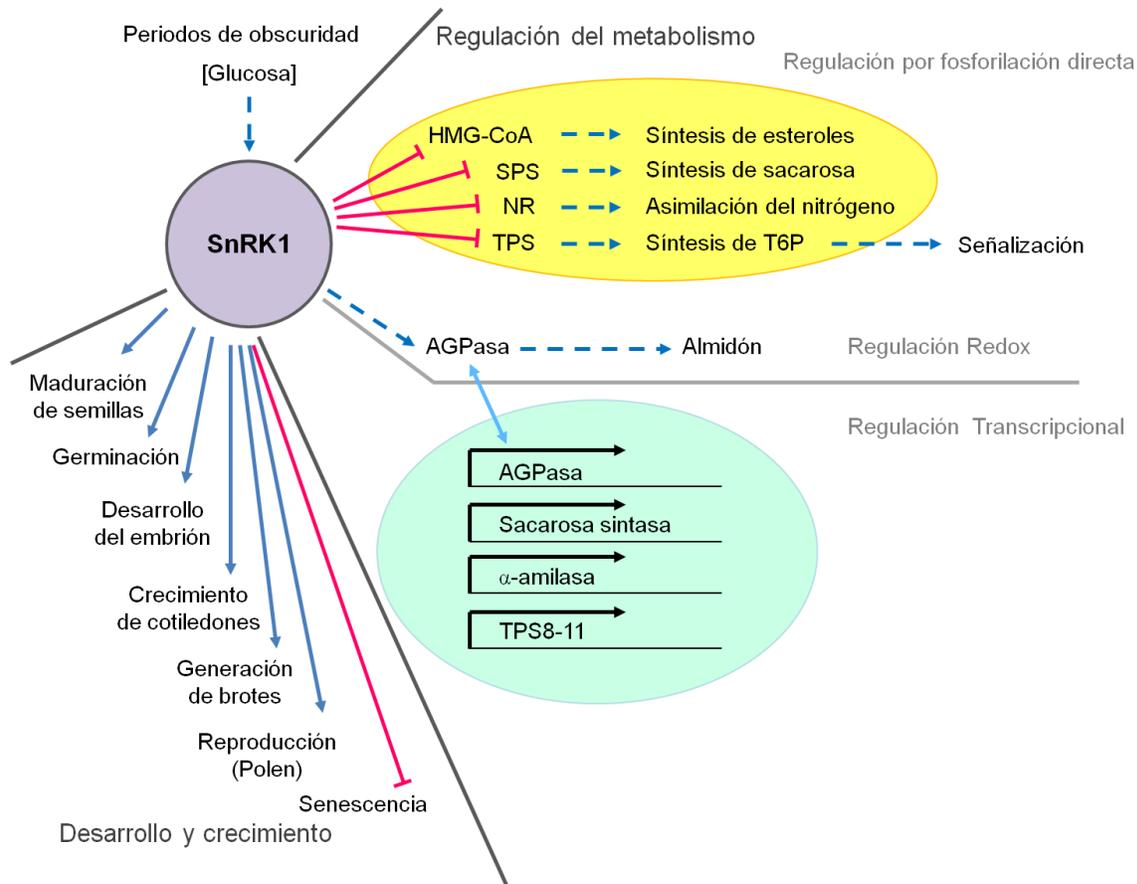


Figura 2. Respuestas mediadas por las SnRK1 frente al estrés. En plantas, el complejo heterotrimérico SnRK1 desencadena respuestas celulares en diferentes ámbitos. Estos incluyen la regulación del metabolismo a través de modificaciones post-traduccionales; aunque también pueden aumentar los niveles de expresión de transcritos, cuyas proteínas tienen importancia metabólica. Un caso especial es la AGPasa, enzimas que es regulada por la SnRK1 mediante su estado Redox y transcripcionalmente. En los procesos sistémicos, la SnRK1 está involucrada en procesos de desarrollo, crecimiento y reproducción.

Además, el complejo SnRK1 coordina las respuestas inducidas por estrés, la resistencia al estrés salino, la defensa antiviral y los procesos fundamentales de desarrollo. De estos últimos, recientemente se demostró que las SnRK1 también están involucradas en la regulación del ciclo celular (Guérinier et al., 2013) y otros procesos del desarrollo como la maduración de las semillas, la germinación, el desarrollo del embrión y crecimiento de los cotiledones, la generación de brotes, reproducción (desarrollo del polen) y la senescencia (Lovas, Sós-Hegedus, Bimbó, & Bánfalvi, 2003; Radchuk et al., 2010; Rolland, Moore, & Sheen, 2002; Wingler, Masclaux-Daubresse, & Fischer, 2009; Zhang et al., 2001) (Figura 2). Estudios fenotípicos de mutantes que tienen una elevada actividad de SnRK1 indican



que estas plantas son capaces de desarrollarse en medios deficientes de glucosa y en condiciones de luz reducida, lo que disminuye la tasa fotosintética. Mientras que las plantas del tipo silvestre entran al estadio de senescencia rápidamente, las mutantes sobreviven durante más tiempo (Baena-González et al., 2007).

3. Estructura del complejo SnRK1

El complejo SnRK1 existe en forma de complejos heterotriméricos que comprenden una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras, una β y otra γ (Hardie, 2007). Esta conformación es necesaria para que la proteína, en conjunto tenga actividad de cinasa.

El estudio de estas subunidades en diversos organismos eucariontes ha conducido al conocimiento de varios genes que codifican para ellas, de tal manera que se ha sugerido que el número de complejos que pueden formarse varía de acuerdo al número de isoformas que presenta cada subunidad (Polge & Thomas, 2007). El genoma de *S. cerevisiae* contiene un gen que codifica para la subunidad catalítica (Snf1), tres genes para las subunidades β -SNF1 (Sip1, Sip2 y Gal83) y un gen para la subunidad γ -SNF1 (Snf4). En mamíferos, existen dos genes que codifican para la subunidad catalítica ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), dos para las subunidades reguladoras β ($\beta 1$ y $\beta 2$) y tres genes de las subunidades γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$). Como se muestra en la Figura 3, en *Arabidopsis thaliana*, que es una planta modelo con el genoma secuenciado, existen tres genes para las subunidades catalíticas, pero solo dos de ellos se expresan (AKIN10 y AKIN11), tres genes para las subunidades β -SnRK1 (AKIN $\beta 1$, AKIN $\beta 2$ y AKIN $\beta 3$) y un gen para la subunidad γ (AKIN γ) (Polge & Thomas, 2007). La subunidad α , es especialmente importante debido a que presenta un alto grado de conservación entre las especies en las que se ha estudiado, las subunidades catalíticas de estos complejos presentan una identidad cercana al 48%, pero si se restringe el análisis al dominio de cinasa, comparten entre el 60 y 65% de la secuencia respecto a sus homólogos en los otros reinos eucariontes (Carling et al., 1994; Halford & Hey, 2009).

Todas estas subunidades contienen un dominio de cinasa treonina/serina (Thr/Ser) altamente conservada (Thr-210 en SNF1, Thr-172 en AMPK y Thr-172 en plantas) en el N-terminal (Hardie, 2007), donde se lleva a cabo la fosforilación. Hacia el C-terminal de las subunidades catalíticas se localiza el sitio de autoinhibición (AIS, autoinhibitory site) que tiene como función inhibir la actividad del dominio de cinasa. También en el C-terminal hay



una región denominada α -CTD (C-terminal Domain) que es la encargada de unirse a la subunidad reguladora β para llevar a cabo la formación del complejo (Figura 3).

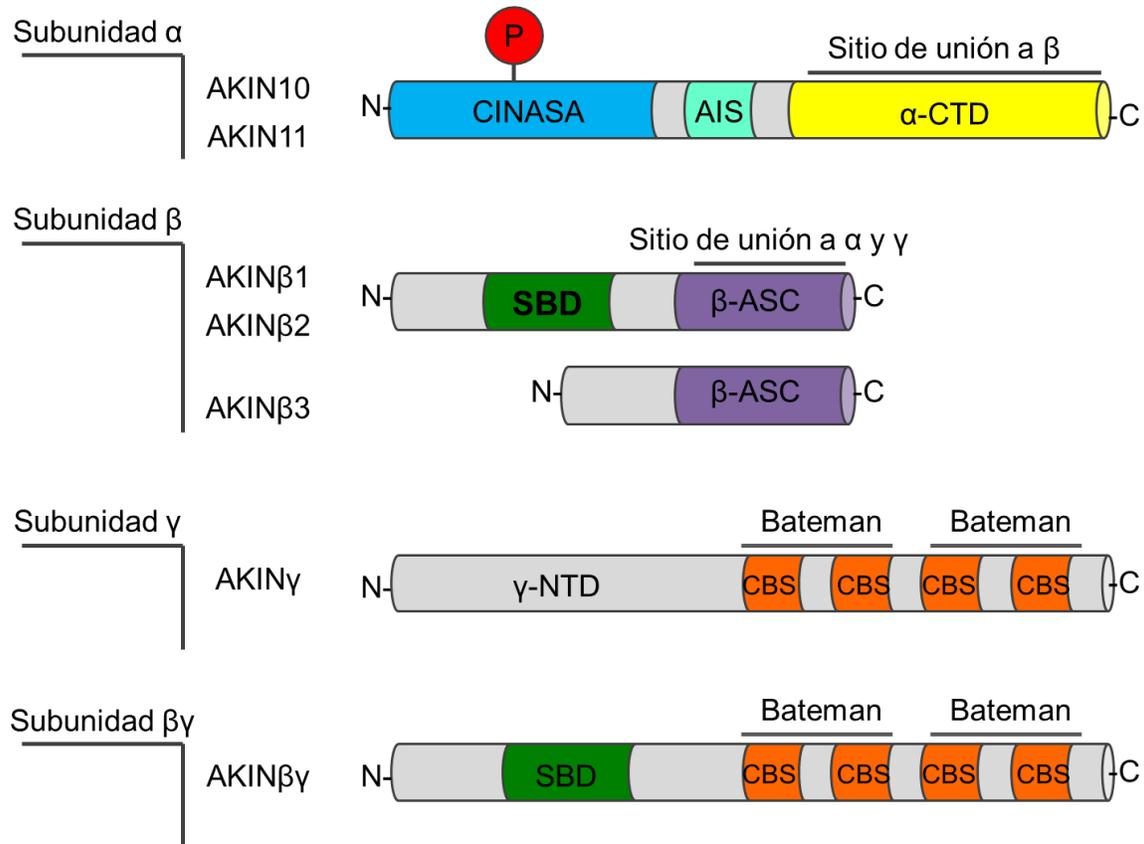


Figura 3. Estructura de las subunidades que conforman el complejo SnRK1 en *A. thaliana*. En *Arabidopsis thaliana* existen 7 genes que codifican para las subunidades que se organizan en heterotrimeros para formar un complejo activo. AIS (Autoinhibitory Site), α -CTD (C-terminal Domain), SBD (Starch Binding Domain), β -ASC (Association with SNF1 complex), γ -NTD (N-terminal Domain) y CBS (Cystathionine β -synthase Motif). (Modificado de Hardie, 2007)

Existen también dos tipos de subunidades reguladoras, una del tipo β y otra del tipo γ . Ambas tienen como función principal establecer mecanismos de modulación de la actividad de cinasa del complejo. Las subunidades β presentan dos dominios: el dominio ASC (association with SNF1 complex), es importante para la interacción con las subunidades α y γ , permitiendo la formación del heterotrímero (Ghillebert et al., 2011; Polge & Thomas, 2007). El segundo dominio está especializado en la unión a carbohidratos y se denomina GBD (Glycogen Binding Domain, en plantas SBD, Starch Binding Domain), que es el



responsable de la interacción del complejo con la molécula de glucógeno en mamíferos y levaduras y con el almidón en plantas (Avila-Castañeda et al., 2014).

En cuanto a la estructura de las subunidades γ , ha sido posible identificar cuatro motivos Cistationina β -sintasa (CBS) en el C-terminal. Estos motivos forman dos dominios Bateman que permiten la unión de nucleótidos de adenina como el AMP y ATP (Hardie, 2007) y que posiblemente tengan la función de actuar como sensores del estado energético. Lamentablemente en plantas hay información escasa sobre la capacidad de las subunidades tipo γ de unir nucleótidos de adenina. En el N-terminal existe el dominio γ -NTD (N-terminal domain) especializado en la unión con la subunidad β y la formación del complejo.

Los estudios realizados en los complejos SnRK1 de plantas concuerdan en que la estructura de las subunidades contiene los dominios principales que ya fueron descritos en otros eucariontes (Figura 3). Sin embargo, únicamente en plantas ha sido encontrada una subunidad híbrida que posee un dominio homólogo al SBD de las subunidades β en el N-terminal y los cuatro motivos CBS, característicos de las subunidades γ en el C-terminal (Lumbreras, Alba, Kleinow, Koncz, & Pagès, 2001; Polge & Thomas, 2007), por lo que recibió el nombre de AKIN $\beta\gamma$.

También en plantas ha sido identificada una subunidad que carece del SBD pero que en experimentos usando células mutantes de levadura *sip1 Δ* *sip2 Δ* *gal83 Δ* presenta la asombrosa capacidad de complementarla, indicando que es capaz de formar un heterotrímero (Gissot et al., 2004).

4. Regulación de la actividad de las cinasas SNF1/AMPK/SnRK1

La regulación de la actividad en los complejos heterotriméricos SnRK1 se lleva a cabo a diferentes niveles. A continuación se mencionan los mecanismos que ya han sido identificados a través de los cuales se modula la actividad de SnRK1.

Uno de los mecanismos a través del cual se regula la actividad del complejo SnRK1 es la fosforilación/desfosforilación del complejo. En todos los casos, la activación sucede gracias a la participación de cinasas río arriba que fosforilan a las proteínas SNF1/AMPK/SnRK1 en una treonina/serina (Thr-Ser) altamente conservada en el asa de activación de la



subunidad catalítica α y la defosforilación por fosfatasas (Figura 4). Hasta la fecha han sido identificadas dos cinasas rio arriba que fosforilan a las SnRK1 denominadas GRIK1 y GRIK2 (Germinivirus replication interacting kinase 1/2) que fosforilan en la treonina 175 (Thr-172) de la subunidad catalítica AKIN10 y a la 176 de AKIN11 (Harthill et al., 2006; Shen, Reyes, & Hanley-Bowdoin, 2009). La identificación de las proteínas GRIK1/2 como SnAK (SnRK1 activating kinase) ocurrió gracias a la complementación de la triple mutante de levadura *sak1 Δ elm1 Δ tos3 Δ* (Shen 2006) y a la fosforilación *in vitro* de la subunidad catalítica (Shen et al., 2009). Las SnAK, son independientes de los iones Ca^{2+} aunque es necesaria su autofosforilación para presentar actividad sobre las SnRK1 (Crozet et al., 2010).

En contra parte, la defosforilación e inhibición de la proteína SnRK1 se lleva a cabo por proteínas fosfatasas del tipo 2 (PP2C) (Ghillebert et al., 2011). Recientemente, en plantas, se identificaron dos proteínas fosfatasas del tipo 2 (ABI1 y PP2CA) que interactúan con la subunidad catalítica y que potencialmente podrían actuar como fosfatasas de la SnRK1 (Rodriguez et al., 2013), aunque su mecanismo de regulación aún no es claro.

Además de estas modificaciones covalentes, la unión de metabolitos a las subunidades reguladoras cambia la actividad del complejo. La unión del AMP en los dominios Bateman reduce la cantidad de complejo defosforilado, y por lo tanto inactivo. Existe evidencia experimental que sustenta la idea de que la unión con el AMP en los dominios Bateman de las subunidades reguladoras γ , puede proteger de la defosforilación al heterotrímero (Figura 2 y 4).

En el caso específico de las plantas, la actividad de SnRK1 puede verse afectada por azúcares como la T6P, glucosa-6-fosfato (G6P), glucosa-1-fosfato (G1P), glucosa y sacarosa. En las plantas, la T6P es considerada como uno de los reguladores con más influencia sobre la SnRK1. Este metabolito se encuentra en muy bajas concentraciones en tejidos vegetales, donde es considerado como una molécula señalizadora (Schluepmann, Berke, & Sanchez-Perez, 2012), cuya acumulación está estrechamente relacionada con la cantidad de sacarosa. Estudios del efecto inhibitorio de estos azúcares demostró que el mayor efecto tiene lugar en presencia de T6P, seguido por la G1P y la G6P. La G1P además actúa sinérgicamente a la T6P para inhibir la actividad de SnRK1 (Nunes et al.,



2013). Se ha propuesto la participación de un intermediario presente en semillas y tejido joven para llevar a cabo la inhibición (Figura 4).

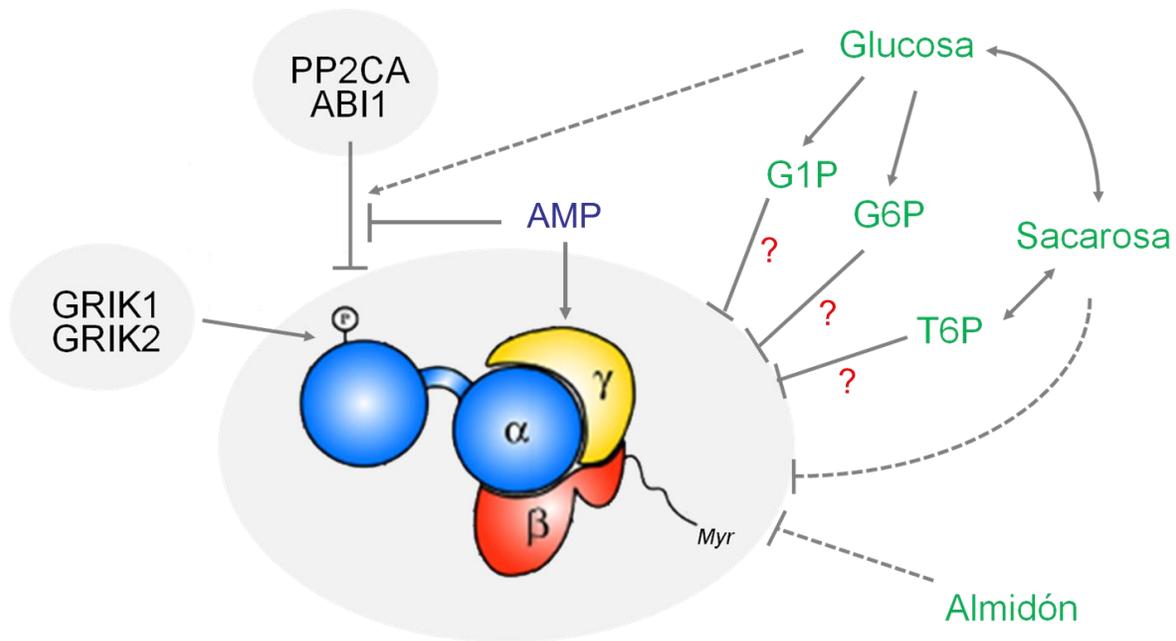


Figura 4. Regulación del complejo SnRK1. La regulación del complejo puede darse a diferentes niveles que incluyen la fosforilación por cinasas río arriba y fosfatasas que lo desfosforilan. Ambas proteínas están reguladas por la concentración de AMP en el medio. Por otro lado (en verde) se encuentra la regulación por azúcares y las modificaciones post-traduccionales que modulan la actividad de cinasas así como la localización subcelular (Modificado de Crozet et al., 2014)

Recientemente se comprobó que los polisacáridos, el almidón en particular, tienen un efecto inhibitorio en la actividad de SnRK1 (Avila-Castañeda et al., 2014).

5. SBD/GBD de las subunidades reguladoras β

Los Dominios de Unión a carbohidratos se localizan en un gran número de proteínas que pueden unir almidón, glucógeno o carbohidratos relacionados de acuerdo a su estructura y son clasificados en diferentes familias de Módulos de Unión a Carbohidratos (CBM, Carbohydrate-Binding Module) (Janeček, Svensson, & MacGregor, 2011).

La longitud de un dominio SBD es en promedio de 100 residuos de aminoácidos y de manera muy importante, han sido encontrados en el 10% de las enzimas amilolíticas (Svensson, Larsen, Svendsen, & Boel, 1983). Se considera que en las enzimas amilolíticas,



el SBD confiere a la proteína la habilidad de unirse fuertemente al almidón, acercando el sustrato al sitio catalítico (Janeček et al., 2011).

Actualmente ya han sido caracterizadas varias proteínas de este tipo que contienen un SBD, entre ellas se pueden citar varias proteínas de la familia glucósido hidrolasa (GH) como la α -amilasa (Lo et al., 2002) y β -amilasa (Mikami et al., 1999) que hidrolizan el enlace α -1,4 del almidón, también en este grupo se localizan las ciclodextrin glucanotransferasas (CGTasa) (Fujita et al., 1989), y glucoamilasas (Svensson et al., 1983). En plantas, el SBD ha sido encontrado en una serie de proteínas, tanto amilolíticas como no amilolíticas, que incluyen a las dextrinasas, a la isoforma 2 de la 4- α -glucanotransferasa conocida como DPE2 (Disproportionating enzyme-type 2) que transfiere un grupo glucosídico de una molécula de maltosa a un oligosacárido, GWD3 (Phosphoglucan water dikinase 3) importante en el inicio de la degradación de los gránulos de almidón (Janeček et al., 2011), así como las subunidades reguladoras β del complejo SnRK1 y sus homólogos en otros eucariontes.

Las subunidades β -SNF1, β -AMPK y β -SnRK1 son miembros de la familia CBM48 que en particular presentan características de un dominio de N-isoamilasa, es decir, presentan la particularidad de unirse a carbohidratos que contienen enlaces α -1,6. En eucariontes, el SBD de las subunidades β se encuentra altamente conservado. Se ha probado que este dominio en la subunidad β 1-AMPK es capaz de unirse, *in vitro*, al glucógeno (Polekhina et al., 2003) y que regula la actividad de AMPK cuando se une a los puntos de ramificación (enlaces α -1,6) de la molécula de glucógeno (McBride, Ghilagaber, Nikolaev, & Hardie, 2009).

También se ha propuesto que la función de este dominio es localizar al complejo cerca de proteínas blanco. Las subunidades β -AMPK coinmunoprecipitan con proteínas blanco que también se encuentran unidas al glucógeno. Un ejemplo de esto es la enzima glucógeno fosforilasa (Sakoda et al., 2005) que se fosforila y es regulada directamente por la AMPK (Hedbacker, Townley, & Carlson, 2004; Vincent, Townley, Kuchin, & Carlson, 2001; Wojtaszewski, Jørgensen, Hellsten, Hardie, & Richter, 2002).

En años anteriores fue posible dilucidar la estructura cristalográfica del GBD de β 1-AMPK (*R. norvegicus*) en presencia de β -ciclodextrina como simulador de la molécula de



glucógeno. La estructura mostrada en la Figura 5, reveló que en la unión proteína-glucógeno participan varios aminoácidos entre los que se encuentran W100, K126, W133 y N150 (Polekhina et al., 2005). Su participación fue confirmada por mutaciones que resultaron en la pérdida total o parcial de la unión (McBride et al., 2009; Polekhina et al., 2003).

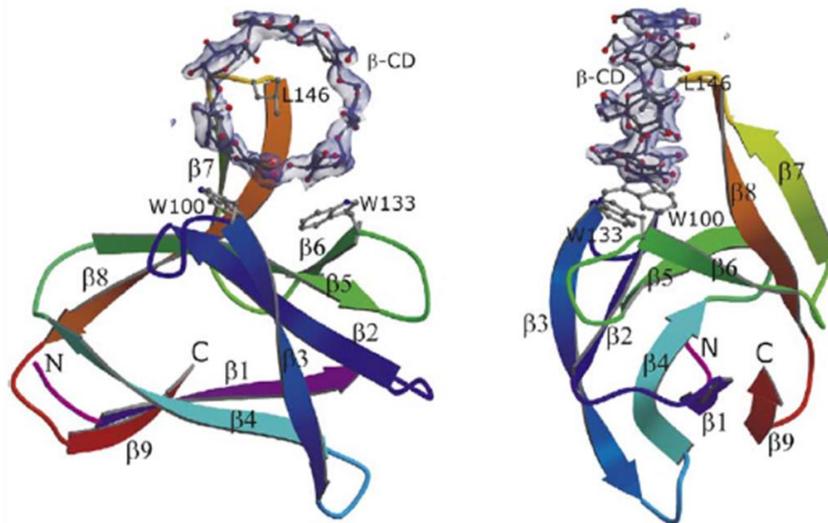


Figura 5. Estructura tridimensional del β -GBD de *R. norvegicus*. Vistas ortogonales del modelo cristalográfico en donde se aprecian las hojas β forma de listón de la estructura del GBD de la subunidad $\beta 1$ del complejo AMPK. La β -ciclodextrina se representa con esferas y bastones, simula la amilosa presente en el almidón (tomado de Polekhina et al., 2005).

El papel que juega el SBD de las subunidades β -SnRK1 y su estructura no ha sido estudiado a profundidad, pero el análisis de la secuencia del SBD y su comparación con el GBD de $\beta 1$ -AMPK (Figura 6) revelaron que las subunidades de *A. thaliana* conservan algunos de los aminoácidos reconocidos como determinantes para lograr la unión (Avila-Castañeda et al., 2014). Las mutaciones en los aminoácidos implicados en la unión revelaron que el cambio en cualquiera de los dos triptófanos (W100 y W133) provoca la pérdida de la unión entre el glucógeno y la proteína. La subunidad AKIN $\beta 1$, según el alineamiento de la Figura 6, carece del W133, mientras que la proteína AKIN $\beta 2$ conserva ambos triptófanos.



AKIN β 1 (92-178)	FDNPPEQ-GIPTIITWNQGGNDVAVEGSDN W RSR---KKLQKSGKDHSILFVLPSTGIYHY K VIVDGESSKYIPDLPFVADEVGNV C NIL-DV
AKIN β 2 (94-180)	EEASNEQ-GIPTMITWCHGGKEIAVEGSDN W KTR---SRLQKSGKDFIMKVLPSGVYEY R FIVDGG W RHAPLPLARDAGNT F NIL-DL
AKIN β γ (12-120)	NSAAAGQLLTPTRFVWPYGGRRVFLSGSFT W TEHVPMSPLEGCPTVFQVICNLTPGYHY K FFDVG W RHDEHQPFVSGNGGV N TIFITG
<i>R. norvegicus</i> β 1 (70-154)	FEKAPAQ-ARPTVFRWTGGGKEVYLSGSFHN W SK---LPLTRSQNNFVAILDLPEGEHQY K FFVDG W THDPSEPIVTSQLGT N NII-QV

Figura 6. Alineamiento de las secuencias del SBD de *A. thaliana* y del β -GBD de rata. Los aminoácidos relevantes para la unión se señalan con asteriscos rojos en la parte inferior. Los aminoácidos conservados se resaltan en negritas. La subunidad AKIN β 2 conserva los dos triptófanos (W) que participan directamente en la unión con el polisacárido (Tomado de Ávila-Castañeda et al., 2014)

Más aún, la comparación de los modelos tridimensionales de las estructuras del SBD de las subunidades AKIN β 2 y AKIN β γ con la estructura cristalográfica de β 1-GBD del AMPK, revelan que la topología es muy parecida (Figura 7) (Avila-Castañeda et al., 2014).

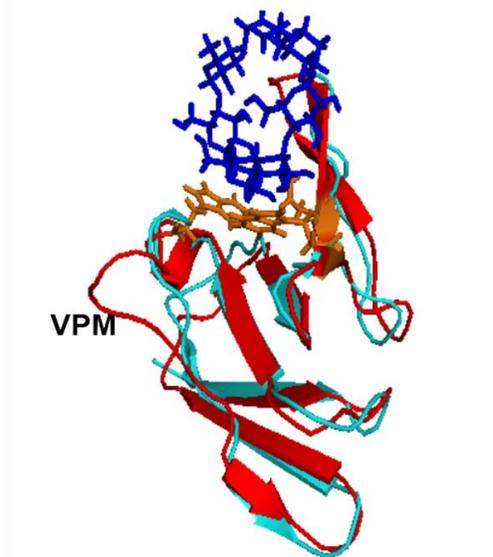


Figura 7. Predicción de la estructura tridimensional de la subunidad AKIN β 2. El modelo cristalográfico del GBD de la subunidad β 1-AMPK, se utilizó para predecir la estructura tridimensional del SBD de la subunidad AKIN β 2 (cian). Las características estructurales se conservan al estar unida a la ciclodextrina que simula a la molécula de almidón. En rojo se muestra la estructura del SBD de la subunidad AKIN β γ y en azul la estructura de la ciclodextrina (Tomado de Ávila-Castañeda et al., 2014).



6. El almidón

El almidón es un homopolisacárido constituido en su totalidad por moléculas de glucosa unidas por un enlace glucosídico. En las plantas, que poseen la capacidad de sintetizar y degradar almidón (Tetlow et al., 2004), representa el almacén energético más grande. Este se acumula durante el día en forma de gránulos y es degradado durante la noche, proporcionando un suministro continuo de carbohidratos en periodos en donde no hay fotosíntesis. Las hojas participan como reservorios del almidón transitorio, que debe ser degradado en un corto periodo de tiempo (el ciclo normal día-noche). El almidón también se encuentra en amiloplastos de tejidos no fotosintéticos como raíces, semillas y tubérculos para ser usado como fuente de energía a largo plazo. En estos tejidos recibe el nombre de almidón de reserva. En semillas de *A. thaliana*, es acumulado como almidón transitorio para la germinación, aunque la principal fuente de carbono son los lípidos (Andriotis, Pike, Kular, Rawsthorne, & Smith, 2010).

El almidón está formado por moléculas de glucosa unidas por un enlace α -1,4 en la parte lineal, mientras que en los puntos de ramificación la unión está formada por enlaces α -1,6. A diferencia del glucógeno, que es soluble en agua, el almidón tiene una estructura semicristalina insoluble en agua, formada por dos tipos de moléculas: amilosa y amilopectina.

La amilosa es el componente minoritario (10-30%) en la estructura del gránulo, está formada casi exclusivamente por enlaces glucosídicos α -1,4 (Figura 7). Las unidades de glucosa se unen hasta formar una cadena lineal de aproximadamente 1000 unidades (Streb & Zeeman, 2012). Esta molécula puede adoptar una estructura secundaria de hélice orientada aleatoriamente al interior del gránulo por lo que se propone como una manera de llenar el espacio dejado por la matriz de amilopectina (Kozlov, Blennow, Krivandin, & Yuryev, 2007). Estudios realizados con plantas donde la síntesis de amilosa fue abatida, revelaron que esta no es necesaria para la formación del gránulo (Shure, Wessler, & Fedoroff, 1983; Tsai, 1974).

La amilopectina (Figura 8) se considera una molécula ramificada, y esas ramificaciones se generan por la formación de enlaces α -1,6 que se presentan aproximadamente cada 20-25 unidades de glucosa en una cadena lineal (Streb & Zeeman, 2012). La longitud de estas cadenas individuales, a partir de la ramificación, varía entre 6 y 100 moléculas de glucosa.



El resultado es una molécula de amilopectina que consta de 100 000 y 1 000 000 de unidades de glucosa. La amilopectina se encuentra formando entre el 70-90% del peso de un gránulo de almidón, mientras que la amilosa equivale al resto.

Además de los componentes habituales, en los gránulos de almidón se encuentran proteínas asociadas a ellos como es el caso de todas las enzimas implicadas en su metabolismo, así como lípidos y algunos iones.

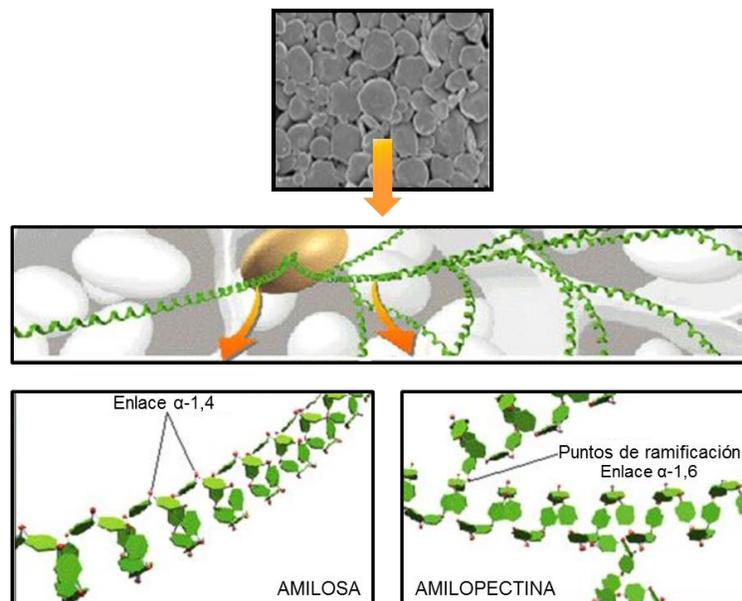


Figura 8. Composición del gránulo de almidón. La morfología lenticular es característica de los gránulos de almidón sintetizados y almacenados en los tilacoides de los cloroplastos en las hojas de *A. thaliana* (Tomado de Streb & Zeeman, 2012). Estos gránulos se componen de dos moléculas: amilosa y amilopectina.



III. ANTECEDENTES INMEDIATOS

Reportes realizados con anterioridad revelaron que la subunidad AKIN $\beta\gamma$ se asocia directamente a los gránulos de almidón y a las subunidades catalíticas AKIN10 y AKIN11. Lo anterior propuso que su unión a los gránulos de almidón pudiera estar mediada por el SBD, dominio característico de las subunidades β -SnRK1 y que se encuentra también en la proteína AKIN $\beta\gamma$. Mutaciones en los aminoácidos, que en otros organismos eucariontes han sido reportados como participantes activos en la interacción, y que en *Arabidopsis thaliana* corresponden a la N97 y W43, provocan la disminución de la afinidad por el carbohidrato, en particular con el cambio del W, pero no de la N. Por otra parte, la delección (AKIN $\beta\gamma$ - Δ SBD) de esta secuencia hace que se pierda completamente la unión con el almidón (Figura 9), confirmando que su interacción con el almidón se da a través del SBD.

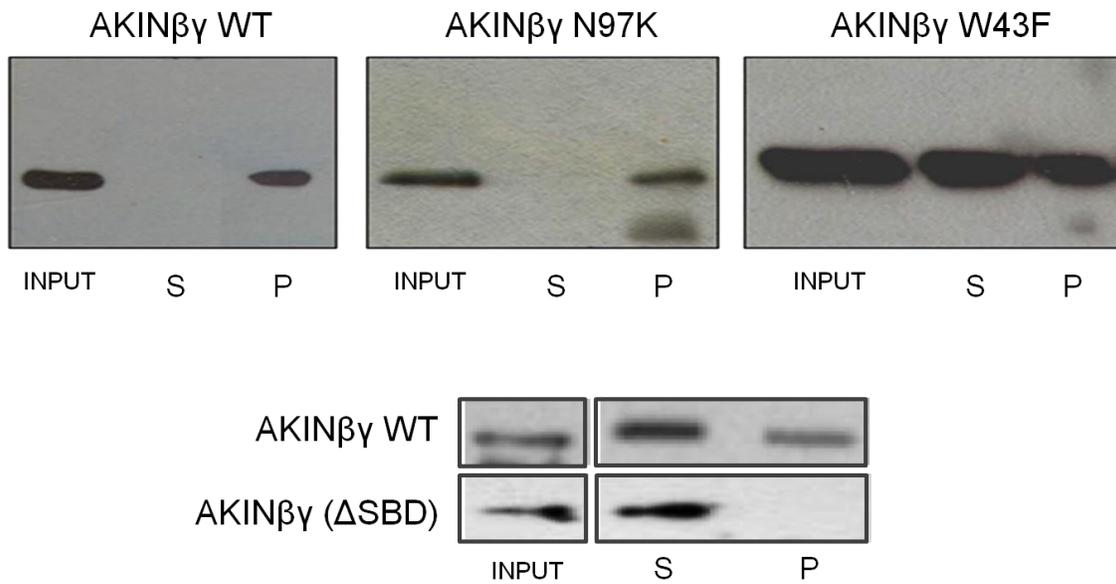


Figura 9. Unión de la subunidad AKIN $\beta\gamma$ con el almidón. La proteína AKIN $\beta\gamma$ (WT) puede unirse al almidón a través del SBD, la proteína se detecta en la fracción unida (pastilla, P). La mutación de los aminoácidos implicados en la unión (W43T), provoca una disminución en la afinidad por el polisacárido. Más aún, la proteína deletada (Δ SBD) pierde completamente la afinidad por el almidón, por lo que se encuentra en la fracción no unida (sobrenadante, S).

Interesantemente, la unión del complejo con el almidón a través del SBD, provoca un decremento importante en la actividad, no así cuando la unión se lleva a cabo a una mezcla



comercial de amilosa-amilopectina que tiene un 70% de la molécula lineal (Ávila-Castañeda A., 2014). Lo anterior sugiere la participación de las subunidades AKIN β y AKIN $\beta\gamma$ como estructuras reguladoras que se unen al almidón, inhibiendo la actividad de SnRK1.

Por otra parte, la subunidad AKIN $\beta\gamma$ fue localizada inicialmente en el citoplasma y en el núcleo (Gissot et al., 2006), aunque estudios posteriores revelaron que esta proteína se localiza también al interior de los cloroplastos (Avila-Castañeda et al., 2014; Gutiérrez-Granados, 2008) colocizándola en el mismo sitio que el almidón. Los únicos datos que se han generado hasta la fecha sobre la localización subcelular de las subunidades β -SnRK1, han sido a través de experimentos de expresión transitoria en epidermis de cebolla. En estos se encontró que las β -SnRK1 se localizan en el núcleo pero no fue posible determinar su asociación a los cloroplastos debido al sistema biológico empleado.

La capacidad de unión de las subunidades β -SnRK1 a la molécula de almidón debe estar asociada a la localización de las proteínas en el cloroplastos para una clara relevancia fisiológica.



IV. HIPÓTESIS

La subunidad AKIN β 2 se une al almidón de *A. thaliana* y para que esta interacción tenga relevancia a nivel fisiológico, debe de encontrarse dentro de los cloroplastos.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Evaluar la capacidad de unión al almidón de la subunidad AKIN β 2 del complejo SnRK1 y determinar su localización subcelular.

2. Objetivos Particulares

- Sobreexpresar a la subunidad AKIN β 2 en células *E. coli* BL21-RIL.
- Realizar ensayos de unión *in vitro* de la subunidad AKIN β 2 al almidón proveniente de *A. thaliana* y otras fuentes vegetales.
- Determinar la localización subcelular de la subunidad AKIN β 2 a través de inmunodetecciones en cortes de tejido de *A. thaliana*.
- Confirmar la localización subcelular mediante ensayos bioquímicos.



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Los experimentos realizados con material biológico fueron elaborados en su totalidad con plantas de *Arabidopsis thaliana* del tipo silvestre (WT, wild type) variedad Columbia.

1.1 Germinación de las semillas y crecimiento de plantas de *A. thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* se germinaron en tierra (Metromix-200), para lo cual se colocaron en la superficie del sustrato y se taparon para evitar la pérdida de humedad. Se colocaron a 4°C durante 3 días en oscuridad y posteriormente se trasladaron a una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de día corto (8h luz/16h oscuridad) a 22°C.

A las dos semanas de edad, las plántulas se trasplantaron a macetas individuales para continuar su crecimiento en las mismas condiciones. El riego con agua fue alternado y un día a la semana se utilizó la solución nutritiva de Hoagland (6mM KNO₃; 4mM Ca(NO₃)₂·4H₂O; 2mM MgSO₄·7H₂O; 1mM NH₄H₂PO₄; 0.5% Fe-EDTA pH 5.2-5.5; 46µM H₃BO₃; 9µM MnCl₂·4H₂O; 0.8µM ZnSO₄·7H₂O; 0.3µM CuSO₄·5H₂O). A las 5 semanas de edad las rosetas se utilizaron para los diferentes experimentos.

2. Purificación de plásmido pET101β2

Para la obtención del plásmido, se transformaron células quimiocompetentes (ver Apéndice) *E. coli* DH5α con el plásmido pET101β2. Después de obtener colonias aisladas, éstas se inocularon en 5mL de medio LB con ampicilina (100µg/mL) y se dejaron crecer a 37°C durante toda la noche (O/N). La purificación se realizó según las instrucciones del kit de purificación de plásmido (Sigma-Aldrich Gen Elute™ Plasmid Miniprep Kit PLN70). Para mayor detalle sobre los pasos de purificación, consultar el Apéndice.

3. Evaluación del plásmido pET101β2

3.1. Ensayo de restricción del plásmido pET101β2

El plásmido pET101β2 se digirió de manera individual con las siguientes endonucleasas: *XhoI* (NewEngland Biolabs), *EcoRI* (Invitrogen) y *EcoRV* (Invitrogen). La restricción se llevó



a cabo a 37°C durante 2h. Los detalles de las soluciones empleadas con cada enzima se describen en el Apéndice.

3.2. Amplificación del cDNA que codifica para la subunidad AKIN β 2

El cDNA correspondiente a la subunidad AKIN β 2 se amplificó utilizando la enzima One *Taq* DNA Polymerase (New England Biolabs M0273S), siguiendo el siguiente programa: 1 ciclo de 5min a 94°C, 30 ciclos de tres temperaturas 30s a 94°C, 30s a 55°C y 1min a 72°C y finalmente 1 ciclo de 5min a 72°C. La secuencia de los primers utilizados para la amplificación del cDNA fueron los siguientes:

β 2For: 5'-CACCATGGGTAACGTGAACGCGAGA-3'

β 2Rev: 5'-CCTCTGCAGGGATTTGTA-3'

Consultar el Apéndice para mayor información sobre la composición de los amortiguadores que se usan con las enzimas.

4. Electroforesis en gel de agarosa

Se prepararon geles de agarosa 1% (m/v) en Buffer TAE (40mM Tris-HCl; 20mM ácido acético glacial; 1mM EDTA pH 8) con bromuro de etidio (1 μ g/mL). Las muestras se prepararon usando buffer de carga de DNA (25% m/v Ficoll 400; 0.25% m/v azul de bromofenol, 0.25% m/v xilen cianol). Finalmente la electroforesis se corrió a un voltaje constante de 80V durante 20 min.

5. Obtención de la proteína recombinante

La obtención de la proteína recombinante se realizó en dos pasos:

5.1. Sobreexpresión de la proteína recombinante AKIN β 2

Células quimiocompetentes *E.coli* BL21-RIL se transformaron con el plásmido pET101 β 2. De las colonias obtenidas, se dejaron crecer precultivos a 37°C en medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) durante toda la noche. Al día siguiente, se inocularon 50mL de medio LB con 2mL del precultivo y se dejó crecer a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm (D.O.600) de 0.6. Al alcanzar esta D.O., se indujo el cultivo con 0.1mM de IPTG a 30°C



durante 3h. Transcurrido el tiempo indicado, el cultivo se centrifugó a 6000xg por 15min. La pastilla se almacenó a -70°C hasta su utilización.

5.2. Purificación de la proteína recombinante

El botón formado tras la inducción se resuspendió en 2mL de Solución de Lisis (300mM NaCl, 50mM NaH₂PO₄ pH 8, 5mM Imidazol), posteriormente se agregó lisozima a una concentración final de 1mg/mL y se incubó durante 30min en hielo. Transcurrido el tiempo, las células resuspendidas se sonicaron con una potencia de 200W. Se emplearon 6 pulsos de 10s, alternando con 10s en hielo. Para eliminar el material genético presente en el lisado celular, se agregó RNasa A (10µg/mL) y DNasa I (5µg/mL) y se incubó en hielo durante 15min. Además se añadieron como inhibidores de proteasas PMSF (Fluoruro de fenilmetanosulfonilo) y benzamidina, ambas a una concentración final de 1mM. El lisado se centrifugó a 10000xg durante 30min a 4°C.

Para la purificación, se recuperaron 2mL del sobrenadante, que representa la fracción soluble, y se incubaron con 500µL de la resina Ni-NTA (Qiagen Ni-NTA Agarose, 30230) en una columna de plástico durante 1h a 4°C. Transcurrido el tiempo, se colectó el lisado (fracción no unida a la columna), se realizaron lavados con 8mL de Solución de Lavado (300mM NaCl; 50mM NaH₂PO₄ pH 8; 20mM Imidazol) y finalmente se recolectaron 4 fracciones de elución con un volumen de 500µL cada una con Buffer de Elución (300mM NaCl; 50mM NaH₂PO₄ pH 8; 250mM Imidazol)

Las fracciones enriquecidas con la proteína, se dializaron en Buffer de Diálisis (50mM Tris-HCl pH 7.0) durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Se realizó un cambio de solución amortiguadora al día siguiente y se continuó con la diálisis durante 30min. La proteína se obtuvo y se almacenó a -70°C hasta su uso.

6. Extracción de proteína total de plantas de *A. thaliana*

Para la extracción de proteínas provenientes de plantas de *A. thaliana*, se pesaron 3g de tejido (hojas o raíz) que se maceraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se agregaron 3mL de Buffer SnRK1 (50 mM Tricina pH 8.0, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.02% Brij 35, 10% glicerol, PVPP (2% w/v), 1mM Benzamidina y 1mM PMSF) y se continuó macerando hasta obtener una mezcla homogénea. El extracto crudo



se colocó en tubos Eppendorf y se centrifugó a una velocidad de 11500xg para separar los restos celulares de las proteínas solubles.

7. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

La proteína total se cuantificó empleando el método Bradford que es un método colorimétrico. Se realizó una curva patrón según la siguiente tabla:

Tabla 1. Curva patrón para la cuantificación de proteína.

BSA 1mg/mL (µL)	Agua (µL)	Bradford 5x (µL)
0.0	800.0	200.0
2.0	798.0	200.0
4.0	796.0	200.0
6.0	794.0	200.0
8.0	792.0	200.0
10.0	790.0	200.0

Las muestras se prepararon de la misma manera, ajustando el volumen final con agua desionizada. Para medir la cantidad de proteína, la curva patrón se leyó en el espectrofotómetro a 595nm. Se realizó una gráfica Abs₅₉₅ vs Concentración de BSA, después se realizó una regresión lineal de la cual se obtuvo una ecuación de la forma:

$$\text{Abs} = m[\text{BSA}] + b$$

Despejando [BSA], y sustituyendo la Absorbancia medida en el espectrofotómetro, se obtuvo la concentración de proteína en cada muestra.

8. Extracción de cloroplastos

La extracción de cloroplastos se hizo a partir de plantas de *A. thaliana* de 5 semanas de edad. La noche anterior a la extracción, las plantas se cubrieron para evitar la síntesis de almidón al inicio del día siguiente.



Hojas de las rosetas de *A. thaliana* se cortaron, lavaron y colocaron en un vaso para licuadora preenfriado. Se agregaron 70mL de Buffer Xpl-BSA frío que contiene 330mM Sorbitol, 50mM HEPES-KOH pH 7.5, 4mM MgCl₂, 0.25% m/v BSA, 0.1% m/v Ácido ascórbico. El tejido se licuó con 4 pulsos cortos de 4 segundos. El homogeneizado se filtró usando dos capas de gasa humedecida con Buffer Xpl-BSA. El filtrado se centrifugó a 2000xg durante 10min a 4°C. El sobrenadante se decantó cuidadosamente dejando al final aproximadamente 200µL para resuspender los cloroplastos con ayuda de un pincel. Los cloroplastos resuspendidos se tomaron con una pipeta Pasteur para evitar su ruptura y se colocaron gentilmente sobre los gradientes de separación que se prepararon en tubos corex colocando cuidadosamente 9.5mL de Percoll 40% sobre 3mL de Percoll 80% (detalles de su preparación se encuentran descritos en el Anexo).

Después de la adición de la mezcla de cloroplastos, los tubos se centrifugaron a 6000xg durante 10min a 4°C. Los cloroplastos intactos se localizan en la interfase de Percoll mientras que los rotos permanecen en la superficie donde originalmente fueron colocados. Tanto el Percoll 40% como los cloroplastos rotos se retiraron con una pipeta de transferencia con cuidado de no tocar los cloroplastos intactos. Estos últimos se retiraron con una pipeta de transferencia y se colocaron en un tubo limpio con 20mL de Buffer Xpl (que no contiene BSA). Los cloroplastos intactos se centrifugaron a 2000xg durante 5 min a 4°C. Se realizaron dos lavados más con 200µL de Buffer Xpl siguiendo el paso anterior. Finalmente, la pastilla de cloroplastos se resuspendió en 100µL de Buffer Xpl.

8.1. Tratamiento con termolisina

El tratamiento con termolisina se realizó con la finalidad de eliminar cualquier proteína asociada de manera inespecífica a la membrana externa del cloroplasto. Se cuantificó la clorofila, para lo cual se tomaron 5µL de cloroplastos y se colocaron en 1mL de acetona 80% v/v, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 10000xg durante 2min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se midió la absorbancia a 652nm. Una vez hecho lo anterior, se utilizó la siguiente ecuación para calcular la concentración de clorofila:

$$[\text{Clorofila}] = (\text{Abs}_{652}/36) \times 200$$



A una alícuota equivalente a la mitad del volumen total de cloroplastos, se le agregó termolisina a una concentración final de 0.1mg/mL y se incubó en hielo durante 30min. Para detener la reacción enzimática, se añadió EDTA (10mM). Los cloroplastos se centrifugaron a 2000xg por 2min. Finalmente se realizaron dos lavados con 100µL Buffer Xpl (ver Apéndice) y la pastilla de cloroplastos se resuspendió en 50µL de Buffer Xpl

9. Extracción de almidón de hojas de *A. thaliana*

La extracción de almidón se realizó a partir de hojas frescas o congeladas de *A. thaliana* de 5 semanas de edad.

Los gránulos de almidón se extrajeron siguiendo el procedimiento descrito por Ritte G., *et al* (2000) a partir de 20g de hojas. El tejido se homogeneizó en un mortero enfriado con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se agregaron 3 volúmenes de Buffer de Extracción (100mM HEPES-KOH pH 8, 5mM DTT, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 0.05% Tween-20) y se siguió macerando hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla se filtró a través de una malla de nylon y se centrifugó por 5min a 3000xg a 4°C. La pastilla se solubilizó en 200µL de Buffer de Extracción y se colocó suavemente sobre Percoll 95% en HEPES-KOH 0.5M pH 7 (Ver Apéndice), se centrifugó nuevamente a 7000xg durante 10min a 4°C. La pastilla, se lavó varias veces en Buffer de extracción hasta que desapareció el color verde, indicativo de residuos de cloroplastos. Los gránulos se lavaron un par de veces con acetona y se dejaron secar a 37°C durante toda la noche. Finalmente, los gránulos secos se tamizaron y se almacenaron a 4°C.

10. Ensayos de unión al almidón

Para los ensayos de unión al almidón *in vitro*, se pesaron 10mg de almidón o una mezcla comercial de amilosa-amilopectina (A/A, 70% amilosa), se agregaron 10µg de proteína, 1 mM PMSF y se llevó a un volumen de 200µL con Amortiguador 50mM Tris-HCl pH 7.5. La mezcla se incubó durante 30min a 4°C en agitación, seguido de una centrifugación a 11000xg durante 2min. El sobrenadante, considerado como la fracción no unida (NU), se colectó y se precipitó con 1mL de acetona a -20°C durante toda la noche. La pastilla que contenía los gránulos de almidón, se lavó tres veces con 1mL de Buffer 50mM Tris-HCl pH 7.5 y se resuspendió en 20µL de buffer de carga. Para recuperar la fracción unida (U), la



pastilla se centrifugó a 11000xg y se colectó el sobrenadante que representa la fracción unida (U).

11. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Para la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) se prepararon geles siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli U.K. (1970). Se usó un gel separador al 12% y un apilador al 4%. A las muestras de proteínas se les añadió buffer de carga (125mM Tris-HCl pH 6.0, 4% m/v SDS, 20% v/v glicerol, 10% v/v β -mercaptoetanol) y se calentaron a 80°C durante 5min. La electroforesis se corrió a un voltaje constante de 120V usando buffer de corrida (25mM Tris pH 8.3, 192mM Glicina, 0.1% m/v SDS) hasta que el frente llegara al final del gel. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad).

12. Tinción de geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se tiñieron empleando azul de Coomassie coloidal (80% v/v etanol, 6.4% v/v ácido fosfórico; 3.2% m/v Brilliant Blue G-250). Después de la electroforesis, los geles se incubaron con el colorante toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Para desteñirlo, el gel se lavó con abundante agua hasta eliminar el exceso de colorante.

13. Detección de proteínas mediante Western Blot

Después de la separación de proteínas por SDS-PAGE, se realizó una transferencia húmeda (buffer de transferencia: 124mM Tris; 96mM Glicina; 20% v/v metanol) a una membrana de PVDF (Merck Millipore Immobilon-P HPV H00010) durante 1h a 100V.

Una vez terminada la transferencia, se procedió a bloquear la membrana durante 1h con solución de bloqueo que contenía 5% leche descremada en PBS– 0.1% Tween (137mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄ pH 7, 2.7mM KCl, 2mM KH₂PO₄, 0.1% Tween-20). Posteriormente, se agregaron los correspondientes anticuerpos primarios en las diluciones establecidas; las membranas se dejaron incubar durante toda la noche a 4°C en agitación constante.



Después de la incubación durante toda la noche, la membrana se lavó 3 veces con 10mL de PBS-Tween durante 10min en agitación. Tras los lavados, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (GE Healthcare, NA9340V) la cual se realizó con un título 1:50 000 en PBS-Tween durante 1h a temperatura ambiente en agitación. Se repitieron los lavados y se reveló la membrana por quimioluminiscencia (Merck Millipore Immobilon Western WBKDS0100) en un fotodocumentador Chemidoc (BioRad).

14. Localización subcelular

Hojas y raíces de *Arabidopsis thaliana* se fijaron y trataron previamente como se describe en Fragoso et al (2009). Los cortes de hoja y raíz se desparafinaron en una estufa a 60°C durante 30 min. Se retiraron los residuos de paraplast haciendo dos lavados de 10min con Citrosolve. El tejido se hidrató aplicando una serie gradual de etanol (100, 100, 96 y 70%) durante 3min cada uno. Las preparaciones se colocaron en PBS (137mM NaCl; 10mM Na₂HPO₄; 2.7mM KCl; 2mM KH₂PO₄) durante 10min, se realizó un cambio de PBS para repetir la incubación.

Los cortes de hojas se bloquearon con 100µL de solución de bloqueo (3% BSA, 0.1% Tritón X-100, 0.01% azida de sodio) durante 4h a temperatura ambiente. Posteriormente, las preparaciones se incubaron con el anticuerpo primario anti-AKINβ2 (dilución 1:200) durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Al día siguiente, se realizaron diversos lavados de 10 min cada uno con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo Alexa 568 (en el caso de los cortes de hoja) o Alexa 488 (para las raíces) durante 4h a 25°C y en oscuridad total. Se realizaron 3 lavados con PBS durante 10 min cada uno. El exceso de PBS se retiró y las preparaciones se montaron con medio de montaje DAKOR. Los cortes se observaron por microscopía confocal.



VII. RESULTADOS

1. Verificación del plásmido pET101β2

Colaboradores anteriores en el grupo de investigación de la Dra. Patricia Coello clonaron la subunidad AKINβ2 en el vector de expresión pET101/D-TOPO (Amp^r).

Con la finalidad de verificar la clonación, se realizaron diferentes ensayos que comprobaron la presencia del cDNA de la subunidad AKINβ2 en dicho vector.

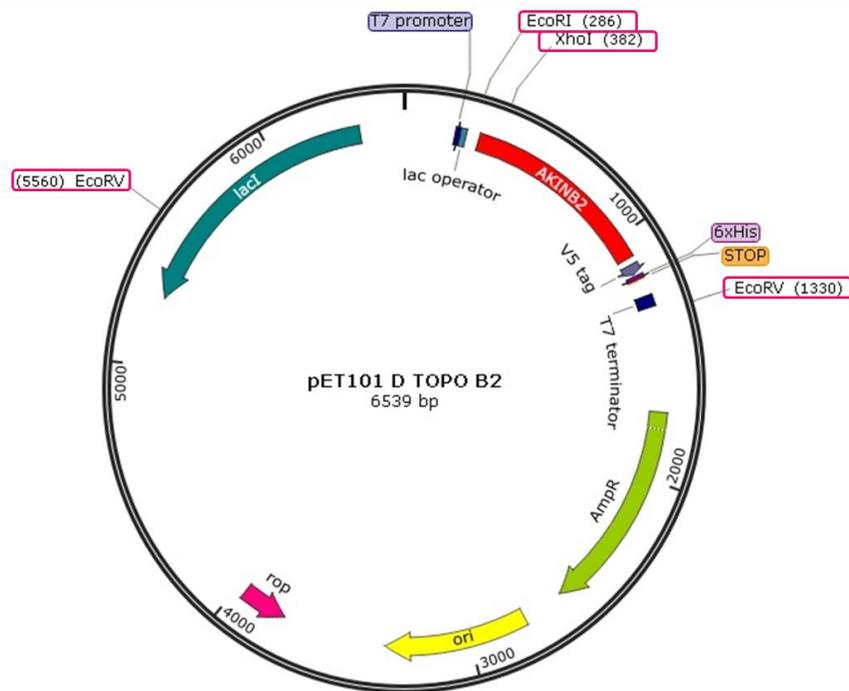


Figura 10. Mapa del plásmido pET101β2. Representación de las características del plásmido pET101β2. En rojo se muestra a la secuencia que codifica para la proteína AKINβ2. Las características propias del vector se muestran en diferentes colores. Los recuadros en rosa señalan los sitios de restricción empleados en el análisis del plásmido

1.1. Evaluación del plásmido con enzimas de restricción

Se realizó el análisis de restricción en el cDNA de la subunidad AKINβ2 (786bp) y el vector pET101/D-TOPO (5753bp). Se seleccionaron tres endonucleasas de restricción para obtener fragmentos de DNA de tamaño específico. Las enzimas que se escogieron fueron *XhoI* (New England Biolabs), *EcoRI* (Invitrogen) y *EcoRV* (Invitrogen).



La construcción pET101β2 (6539bp) contiene un sitio de reconocimiento para las enzimas *XhoI* y *EcoRI*, pero existen dos sitios que reconoce la enzima *EcoRV* (Figura 10). Después de realizada la digestión individual con cada enzima, se realizó una electroforesis en gel de agarosa para separar las bandas e identificar los fragmentos de acuerdo con el patrón de restricción establecido con el mapa del plásmido pET101β2.

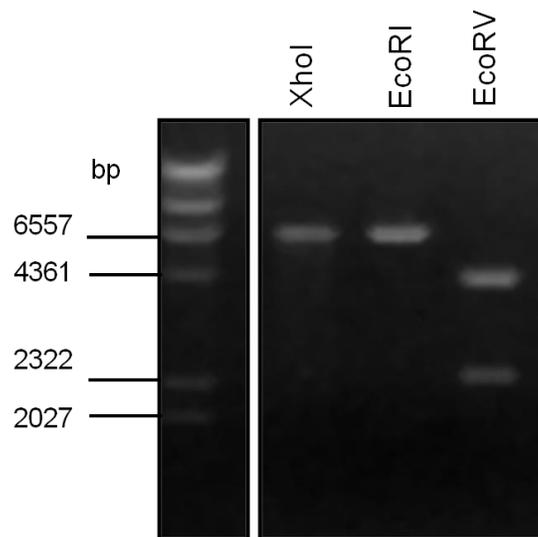


Figura 11. Ensayo de restricción de la construcción pET101β2. Electroforesis en gel de agarosa donde se muestra la digestión del vector pET101β2 con las enzimas de restricción *XhoI* (6539 bp), *EcoRI* (6539 bp) y *EcoRV* (4230 bp / 2039bp). Los pesos moleculares de los fragmentos obtenidos concuerdan con el patrón de bandas establecido por el marcador de peso molecular λ-HindIII.

En la Figura 11 se muestra la electroforesis realizada después de la digestión según la cual, las enzimas *XhoI* y *EcoRI*, deben generar un plásmido lineal debido a que dentro del mismo, solo existe un sitio de reconocimiento para estas enzimas. Las bandas generadas a partir de la digestión con estas dos enzimas tienen un peso molecular de 6539bp. Por otro lado, la enzima *EcoRV* puede reconocer dos sitios de corte en el plásmido pET101β2, generando dos bandas con pesos moleculares de 4230bp y 2039bp.

Las bandas se localizan en el peso esperado tomando como referencia al patrón de bandas del marcador λ-HindIII. Con esta electroforesis se recaudó información importante para



identificar al vector debido a que los sitios de corte para estas enzimas se localizan en la estructura del vector pET101/D-TOPO.

1.2. Evaluación del plásmido mediante amplificación del cDNA de AKIN β 2

Se realizó un PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la subunidad AKIN β 2 y la enzima *One Taq* DNA Polymerase (NewEngland Biolabs). En la Figura 12 se puede observar la banda correspondiente a la amplificación del cDNA de la subunidad AKIN β 2, que tiene un peso molecular por debajo del marcador de 2027bp. Este resultado es consistente con el peso reportado en TAIR (The Arabidopsis Information Resource) que es de 783 pb.

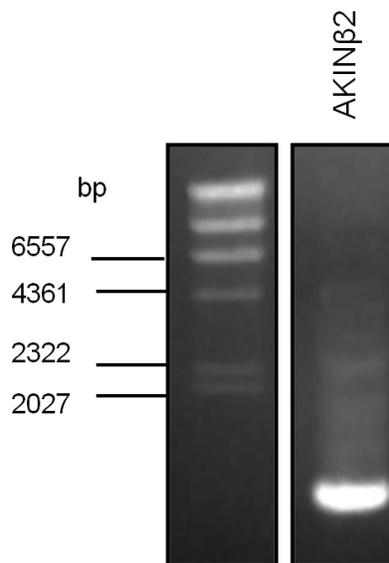


Figura 12. Amplificación del cDNA de la subunidad AKIN β 2. Reacción de PCR con oligonucleótidos diseñados específicamente para la subunidad AKIN β 2. El peso de la amplificación se localiza por debajo del marcador de 2027 bp, coincidiendo con el reportado en TAIR.

1.3. Alineamiento de secuencias

Adicionalmente a las pruebas de verificación realizadas en el laboratorio, se mandó secuenciar el cDNA clonado en el vector de expresión pET101/D-TOPO al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (IFC, UNAM) empleando los oligonucleótidos para el



terminador T7. La Figura 13 muestra el alineamiento realizado entre la secuencia obtenida y la reportada en TAIR (At4g16360). Es posible verificar que la secuencia de nucleótidos clonada en el vector pET101/D-TOPO coincide en su totalidad con la reportada en la literatura para AKINβ2; con lo que se confirmó la identidad del cDNA. Además, se analizó e identificó la secuencia codificante para 6 Histidinas (6xHis) en el extremo 3' de la secuencia (Figura 13, letras rosas). La presencia de los codones que codifican 6 histidinas de manera continua es una característica añadida del vector con la que es posible purificar a la proteína para la que codifica la secuencia clonada.

B2-TAIR	1	ATGGCTATGCTGCTGCTTCTGATGGTAACCATGTCGCTCCTCCTGAGCTTATGGGTCAATCTCCTCCTCATAGCCCTCGAGCTACTCAGTCTCCTCTCA	100
B2-Sec	1	---GCTATGCTGCTGCTTCTGATGGTAACCATGTCGCTCCTCCTGAGCTTATGGGTCAATCTCCTCCTCATAGCCCTCGAGCTACTCAGTCTCCTCTCA	97
B2-TAIR	101	TGTTTGCTCCTCAGGTTCCGGTGCTTCCACTTCAAAGACCTGATGAAATTCATATCCCTAATCCTTCGTGGATGCAATCGCCATCTTCGTGTATGAAGA	200
B2-Sec	98	TGTTTGCTCCTCAGGTTCCGGTGCTTCCACTTCAAAGACCTGATGAAATTCATATCCCTAATCCTTCGTGGATGCAATCGCCATCTTCGTGTATGAAGA	197
B2-TAIR	201	AGTTCTAACGAACAAGGAATCCCTACGATGATCACTTGGTGTCATGGAGCAAGGAGATTGCTGTGGAGGGATCATGGGATAATTGGAAGACAAGAAGT	300
B2-Sec	198	AGTTCTAACGAACAAGGAATCCCTACGATGATCACTTGGTGTCATGGAGCAAGGAGATTGCTGTGGAGGGATCATGGGATAATTGGAAGACAAGAAGT	297
B2-TAIR	301	CGGCTGCAGAGATCTGGGAAGGACTTCACTATCATGAAAGTGTACCTTCAGGAGTCTATGAGTACAGGTTTCATTGTGGATGGACAGTGGAGGCATGCC	400
B2-Sec	298	CGGCTGCAGAGATCTGGGAAGGACTTCACTATCATGAAAGTGTACCTTCAGGAGTCTATGAGTACAGGTTTCATTGTGGATGGACAGTGGAGGCATGCC	397
B2-TAIR	401	CTGAGCTCCCTTTAGCTAGAGATGATGCTGGGAACACTTCAACATTTGGATCTTCAGGACTATGTTCTGAAAGCATTCAAAGCATATCTGGGTTTGA	500
B2-Sec	398	CTGAGCTCCCTTTAGCTAGAGATGATGCTGGGAACACTTCAACATTTGGATCTTCAGGACTATGTTCTGAAAGCATTCAAAGCATATCTGGGTTTGA	497
B2-TAIR	501	GCCTCCGCAATCTCCAAGAAATAGTTACAGCAACTTGCTTCTCGGAGCTGAGGACTACTCTAAAGAACCGCCTGTGGTTCCCCCGCACCTACAATGACA	600
B2-Sec	498	GCCTCCGCAATCTCCAAGAAATAGTTACAGCAACTTGCTTCTCGGAGCTGAGGACTACTCTAAAGAACCGCCTGTGGTTCCCCCGCACCTACAATGACA	597
B2-TAIR	601	CTGCTGAACCTGCCGGCAGCCAATCCTGACATTCATCTCCGCTGCCGAGACCTCAGCATGTCAATCTCAATCATCTTTACATGCAGAAGGGCAAAGTG	700
B2-Sec	598	CTGCTGAACCTGCCGGCAGCCAATCCTGACATTCATCTCCGCTGCCGAGACCTCAGCATGTCAATCTCAATCATCTTTACATGCAGAAGGGCAAAGTG	697
B2-TAIR	701	GTCTCTCTGTGGTTGCGCTTGGTTCCACTCACCGATTTCTAGCAAAGTATGTAAGTGTGGTGTCTACAAATCCCTGCAGAGG-----	800
B2-Sec	698	GTCTCTCTGTGGTTGCGCTTGGTTCCACTCACCGATTTCTAGCAAAGTATGTAAGTGTGGTGTCTACAAATCCCTGCAGAGGAAAGGGCGAGCTCAATTC	797
B2-TAIR	801	-----	882
B2-Sec	798	GAAGCTTGAAAGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCAGGTCATCATCACCATCACCATGA	879

Figura 13. Alineamiento de la secuencia del cDNA de la subunidad AKINβ2 con la reportada en TAIR. El alineamiento de la secuencia clonada en el vector pET101/D-TOPO con la secuencia reportada, reveló una identidad del 100% a excepción del extremo 3', donde se localiza una secuencia para seis histidinas (6xHis, señaladas en color rosa).



2. Obtención de la proteína recombinante AKIN β 2

2.1. Sobreexpresión de la subunidad AKIN β 2

La proteína recombinante AKIN β 2 se expresó en células *E. coli* BL21-RIL. Para lograr una mayor producción de proteína, se probaron diferentes temperaturas de inducción.

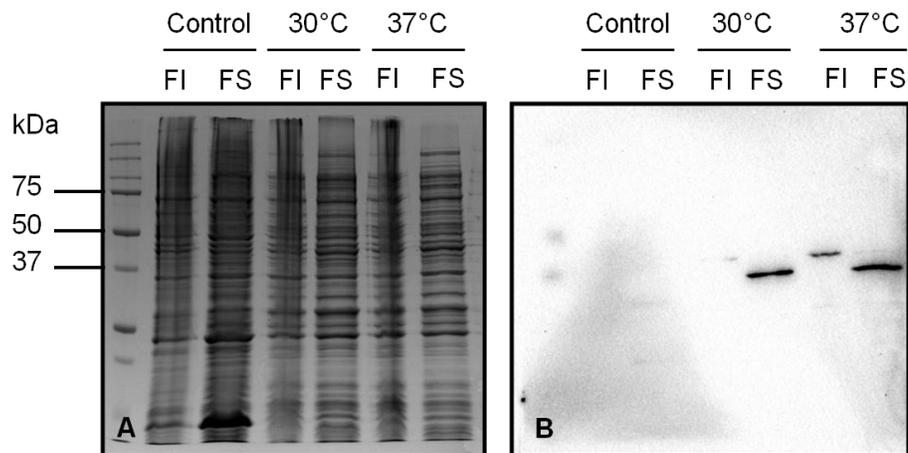


Figura 14. Sobreexpresión de la subunidad AKIN β 2. Las fracciones insoluble (FI) y soluble (FS) fueron obtenidas a diferentes temperaturas de inducción (30 y 37°C) y con 0.1 mM de IPTG. El control se realizó con células *E. coli* BL21-RIL sin transformar con el plásmido pET101 β 2 e inducidas con 0.1 mM de IPTG. A) Gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie. B) Western Blot usando el anticuerpo anti-AKIN β 2 que se aplicó a una dilución 1:50 000.

La sobreexpresión de proteína recombinante no es clara en el gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie (Figura 14.A) debido a que no se observan bandas de intensidad importante en ninguna de las fracciones en comparación con el control.

Aún cuando la producción de la subunidad AKIN β 2 aparentemente no varía respecto al control, el Western Blot revela que el cultivo transformado e inducido genera una cantidad apreciable de la proteína recombinante en la Fracción soluble (FS) (Figura 14.B). La proteína recombinante AKIN β 2 se expresa en cantidades considerables en la FS a 30°C mientras que en la Fracción insoluble (FI) prácticamente no se detectó. En cuanto a la inducción a 37°C, esta temperatura permite también obtener una cantidad importante en la FS, aunque en este caso, si fue posible detectar su presencia en la FI, aunque a un peso molecular ligeramente mayor. La cantidad de proteína en la FI indica el estado de la



molécula, es decir, cuando una proteína se encuentra en la FI significa que la célula ha iniciado la formación de cuerpos de inclusión debido entre otras cosas, al plegamiento incorrecto de la estructura primaria. Cabe resaltar que ninguna de las proteínas endógenas de la cepa *E. coli* BL21-RIL es reconocida por el anticuerpo de la subunidad AKIN β 2 (Figura 14.B, FI y FS del control).

Comparando ambas condiciones de temperatura, se decidió proseguir con los experimentos de escalamiento a una temperatura de inducción a 30°C durante 3h, usando 0.1mM de IPTG.

2.2. Purificación de la proteína recombinante AKIN β 2

Como se mencionó anteriormente, la secuenciación nos permitió corroborar la presencia de una secuencia 6xHis provenientes del vector de expresión. Dicha secuencia facilita la purificación de la proteína debido a que durante la traducción se genera una etiqueta 6xHis que presenta afinidad al átomo de Níquel (Ni). Aprovechando esta característica, se decidió purificar a la subunidad AKIN β 2 usando una resina de agarosa que tiene acoplado un átomo de Ni capaz de atraer a la proteína marcada con la etiqueta 6xHis.

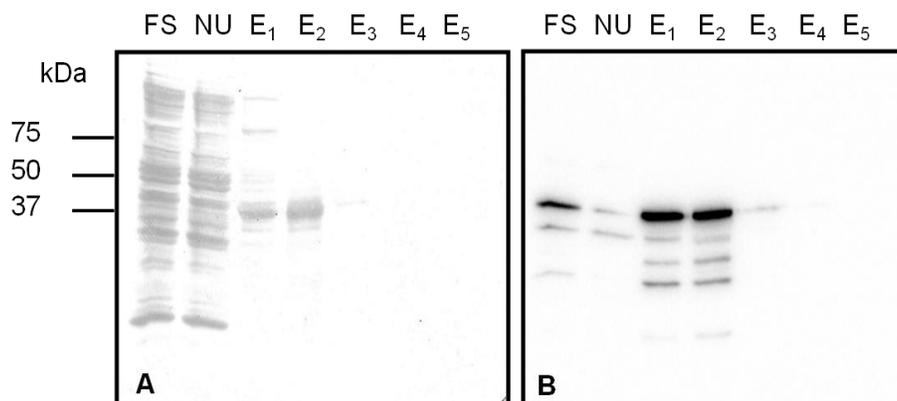


Figura 15. Purificación de la subunidad AKIN β 2. Fracciones obtenidas a partir de la purificación de la proteína recombinante usando una resina de Agarosa Ni-NTA. A) Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau. B) Western Blot usando el anticuerpo anti-AKIN β 2. Se aplicó a una dilución 1:50 000.



La Figura 16 muestra los resultados del Western blot en donde se observa que la unión de la proteína, disminuye cuando el pH del medio aumenta.

Una vez establecido que el pH óptimo para la unión se encuentra entre 6.5 y 7.5, se seleccionaron tres tipos de almidón provenientes de diferentes fuentes naturales y una mezcla comercial de amilosa/amilopectina (A/A) para realizar los ensayos de unión. Los almidones seleccionados para evaluar la capacidad de unión fueron los provenientes de: semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris*), tubérculo de papa (*Solanum tuberosum*) y hojas de *Arabidopsis thaliana*. La mezcla de A/A es una mezcla comercial que contiene 70% de amilosa, 30% amilopectina. Los resultados indican que la proteína AKIN β 2 se une a los tres tipos de almidón, aunque existe cierta preferencia por el carbohidrato obtenido de hojas de *A.thaliana*. En cuanto a la unión a la mezcla comercial, ésta es muy baja y la mayor parte de la proteína se obtiene en la fracción NU.

Los experimentos de unión a polisacáridos de glucosa usando proteína recombinante, mostrados en la Figura 17, indican que la subunidad AKIN β 2 conserva la capacidad de unirse al almidón, independientemente de la fuente de la cual proviene y también lo hace a una mezcla comercial A/A.

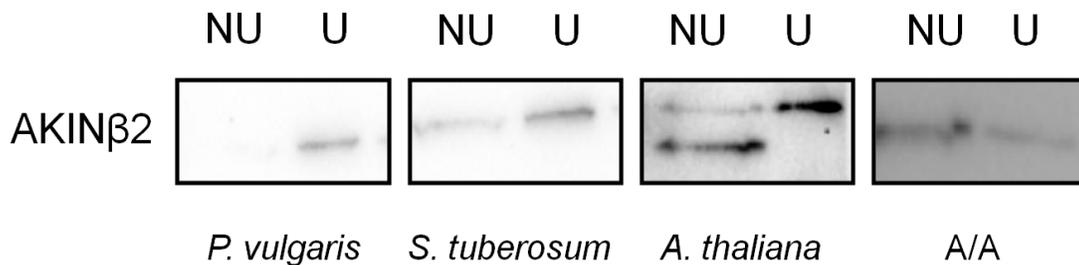


Figura 17. Ensayos de unión al almidón proveniente de diferentes fuentes vegetales. Unión de la proteína AKIN β 2, a pH 7.5, a gránulos de almidón proveniente de diferentes fuentes naturales: frijol, papa y *A. thaliana*. Además se incluyó una mezcla de amilosa/amilopectina (A/A). Se muestra la fracción no unida (UN) y la fracción (U). El anticuerpo se aplicó a una dilución 1:40 000.



4. Localización subcelular de la subunidad AKIN β 2

Hasta ahora, se ha probado que la subunidad AKIN β 2 puede unirse, *in vitro*, al almidón; pero es necesario confirmar que *in vivo* esa unión pueda llevarse a cabo. La primera aproximación para esta evaluación es la localización subcelular, ya que ambas moléculas tendrían que encontrarse en el mismo compartimento para que la interacción se lleve a cabo.

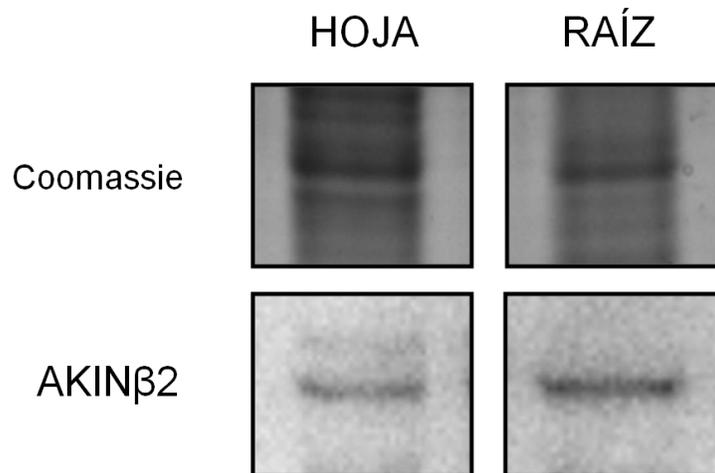


Figura 18. Detección de la subunidad AKIN β 2 en extractos crudos de plantas. De los tejidos separados de hoja y raíz, se obtuvieron extractos crudos en los cuales se identificó a la proteína AKIN β 2. El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:3 000.

Los ensayos de Western blot utilizando extractos crudos de hoja y raíz de plantas de *A. thaliana* indicaron que la cantidad de proteína AKIN β 2 no varía en estos tejidos. En el extracto de hojas se detectó una banda de mayor peso molecular respecto al peso teórico de la AKIN β 2 que es de 37kDa (Figura 18). De acuerdo a los datos publicados ésta proteína puede modificarse postraduccionalmente por la adición de un grupo miristilo que elevaría su peso molecular.

Adicionalmente, ensayos de inmunolocalización utilizando cortes de tejido de hoja y raíz aportaron resultados a nivel subcelular. La señal de AKIN β 2 se puede observar cerca de los cloroplastos, aparentemente asociados a la superficie de la membrana (Figura 19A). La sobreposición de la imagen debida a la fluorescencia del Alexa 568 (anticuerpo secundario)



y de la clorofila no muestra un traslape, lo que implica que esta subunidad no se encuentra al interior de los cloroplastos, o lo hace en muy bajas cantidades.

Para confirmar su presencia predominante por la parte externa de los cloroplastos, se realizó una extracción de estos organelos y se sometieron a un tratamiento con termolisina (T+), mientras que otros permanecieron sin el tratamiento (T-). De esta manera, aquellos cloroplastos sin tratar con termolisina conservan las proteínas que se asocian a ellos, tanto por la parte interna como externa. En cambio, los cloroplastos tratados con termolisina perdieron las proteínas asociadas en la parte externa, con lo que es posible detectar únicamente las proteínas que se encuentran al interior. Los resultados indican que la subunidad AKIN β 2 se encuentra asociada a la membrana externa de los cloroplastos, ya que el tratamiento con termolisina elimina la señal del anticuerpo (Figura 19.B).

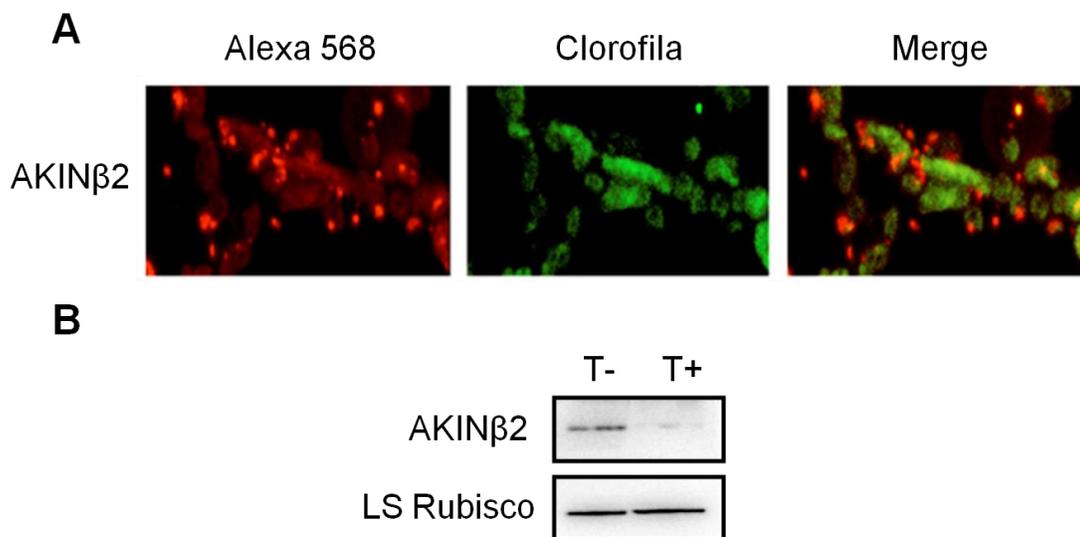


Figura 19. Localización subcelular de la subunidad AKIN β 2 en hojas de *A. thaliana*. A) En rojo se muestra la fluorescencia debida al anticuerpo secundario ALEXA 568 acoplado al anticuerpo primario anti-AKIN β 2 (1:3000) y en verde se observa la autofluorescencia de la clorofila. En la última columna se presenta la sobreposición de las imágenes, donde las zonas amarillas denotan la colocación de la proteína con los cloroplastos. B) Detección de la subunidad AKIN β 2 en cloroplastos extraídos de plantas de *A. thaliana* que fueron sometidos a un tratamiento con termolisina (T+) o no (T-) con la finalidad de comprobar su asociación a estos organelos. La dilución para realizar la detección fue 1:3000. La subunidad pesada de la RuBisCO (Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) se empleó como control de carga.



VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los datos obtenidos en varios grupos de investigación y en nuestro laboratorio indican que las subunidades reguladoras AKIN β contienen un dominio con alta semejanza a nivel estructural con los dominios de unión a glucógeno, además de la presencia de aminoácidos implicados en la unión que están conservados (Avila-Castañeda et al., 2014).

Para evaluar la capacidad de unión al almidón que presenta en particular la subunidad AKIN β 2, se realizaron ensayos de unión *in vitro* con proteína recombinante. Los ensayos de unión indicaron dos cosas, por un lado, que la subunidad tiene la capacidad de unirse al almidón y por otro, que la unión se ve afectada por el pH. Se ha documentado que el pH del estroma de los cloroplastos tiene un valor cercano a 7 durante la noche y se incrementa a valores cercanos a 8 durante el día. Estos datos indican que la subunidad AKIN β 2 se unirá al almidón más activamente durante la noche, cuando el pH es ácido o cercano a la neutralidad.

Los experimentos de unión a polisacáridos de glucosa usando proteína recombinante, indican que la subunidad AKIN β 2 conserva la capacidad de unirse al almidón, independientemente de la fuente de la cual proviene y también lo hace a una mezcla comercial de amilosa/amilopectina (A/A). En la Figura 17, es evidente que la subunidad AKIN β 2 se encuentra mayoritariamente en la fracción unida (U) al almidón, mientras que en presencia de A/A, la mayor parte de la proteína se identifica en la fracción no unida (NU).

Estas diferencias en la afinidad por la molécula de almidón se pueden explicar por el contenido de amilosa, es decir, el grado de ramificación. La amilosa es esencialmente una molécula lineal de glucosa unidas por enlaces α -1,4, aunque existen moléculas de amilosa con unos cuantos puntos de ramificación conectados por enlaces α -1,6 (Fennema O., 2010). De manera natural, existen diferentes proporciones de amilosa en el almidón dependiendo de la fuente vegetal y del tejido del cual ha sido extraído. La papa contiene 23% de amilosa y las leguminosas en general contienen alrededor del 33%. El almidón de *A. thaliana* contiene cerca del 30% de amilosa (Streb & Zeeman, 2012) y la mezcla comercial está compuesta 70% por amilosa. Los datos indicaron que la subunidad AKIN β 2 se une mejor al almidón que presenta un porcentaje mayor de amilopectina, una molécula



muy grande y extremadamente ramificada; lo que posiblemente indicaría una mayor afinidad por los puntos de ramificación, es decir, enlaces α -1,6. Esta misma observación fue hecha para la subunidad β 1-AMPK, que se unen con una afinidad mayor a moléculas ramificadas de glucógeno (McBride et al., 2009). En este caso, se ha sugerido que la unión de la AMPK a través de la subunidad AMPK- β 1 a sitios de ramificación en el glucógeno forma parte de un mecanismo que permite detectar las reservas almacenadas en la célula. La AMPK unida a estos sitios no es activa y en consecuencia no regula a otras enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno. Por el contrario, cuando las reservas comienzan a disminuir y los puntos de ramificación son menos, la AMPK no se une y se encuentra activa, indicando y señalizando a la célula la pérdida de reservas (McBride et al., 2009).

Hasta ahora, se ha probado que la subunidad AKIN β 2 puede unirse *in vitro* al almidón; pero es necesario confirmar que *in vivo* tanto la proteína como el almidón puedan encontrarse en el mismo compartimento subcelular. En primera instancia, los resultados indicaron que tanto en raíz como en hoja la expresión de la proteína es la misma. Interesantemente, en el extracto crudo de hojas se puede observar una banda con peso molecular mayor a 37kDa que es reconocida por el anticuerpo anti-AKIN β 2. La comparación con la masa molecular teórica que se calcula de 29kDa, sugeriría la presencia de alguna modificación post-traducciona. Una de las modificaciones que se han estudiado en las dos subunidades β de *Arabidopsis thaliana* es la miristoilación, que involucra la adición de un ácido graso de 14 carbonos al extremo N-terminal de la proteína y es catalizado por las N-miristoiltransferasas (NMT). La modificación por miristoilación regula negativamente la actividad de la SnRK1, ya que mutantes que carecen de las enzimas NMT tienen una actividad mayor de SnRK1 que las plantas tipo silvestre. Además, el cambio del aminoácido que se miristoíla (G2A), promueve un cambio en la localización de la proteína de la membrana plasmática al citoplasma o núcleo. Estos datos indican que la miristilación tiene un papel muy importante en la regulación de la actividad del complejo de cinasa y también en la localización subcelular (Oakhill et al., 2010; Pierre et al., 2007).

Los estudios sobre la localización subcelular indicaron que la subunidad AKIN β 2 está asociada a la membrana externa de los cloroplastos, lo que implica que AKIN β 2 no interactúa con el almidón *in vivo*. Es posible que la función de las subunidades β -SnRK1 no



estén relacionadas con el almidón o su metabolismo. En su lugar, es probable que la conservación del SBD sea importante para ciertas funciones fisiológicas enfocadas en la unión a carbohidratos más pequeños, monosacáridos o disacáridos, o carbohidratos de señalización como la T6P, G6P y G1P que actúan como inhibidores de la actividad de SnRK1 (Nunes et al., 2013).

Además de estos carbohidratos presentes en el citoplasma, hay que tomar en cuenta a los productos de degradación del almidón. Una vez que el almidón se degrada a maltosa, el disacárido es transportado al citosol (Zeeman et al., 2004) donde será metabolizado por la DPE2 (Cytosolic Disproportionating Enzyme), que es específica para la forma de maltosa que se produce en la degradación del almidón (β -anomérica). Plantas mutantes *dpe2* muestran una acumulación de maltosa hasta 200 veces más que el tipo silvestre (Chia et al., 2004). La DPE2 transfiere una unidad de glucosa proveniente de la maltosa, a una molécula aceptora, que probablemente se trata de una forma de heteroglucano soluble citosólico (Fettke, Chia, Eckermann, Smith, & Steup, 2006). Afortunadamente ya se ha caracterizado al heteroglucano y se sabe que está compuesto por manosa, fucosa, xilosa, ramnosa y glucosa. El análisis de la formación de este carbohidrato indica que el heteroglucano no representa un almacén de glucosa en el citosol sino que las moléculas de glucosa añadidas a partir de la maltosa, tienen una tasa de recambio alta (Fettke, Eckermann, Tiessen, Geigenberger, & Steup, 2005). Esto condujo a la conclusión de que el heteroglucano tiene la función de aceptor de glucosas en el citoplasma y representa una fuente de reservas transitorio en el citoplasma (Chia et al., 2004). Cabe la posibilidad de que el dominio de unión a carbohidratos presente en las subunidades β de la SnRK1, puedan unir algunos de los carbohidratos presentes en el citoplasma y de esta manera señalar su acumulación.



IX. CONCLUSIONES

- Se sobre-expresó la proteína recombinante AKIN β 2 en células *E. coli* BL21-RIL.
- La subunidad AKIN β 2 tiene la capacidad de unirse *in vitro* al almidón extraído de varias fuentes vegetales.
- La unión *in vitro* entre la subunidad AKIN β 2 y el almidón, es dependiente del pH del medio. La afinidad disminuye cuando el pH es 8.5.
- La subunidad AKIN β 2 se encuentra asociada mayoritariamente a la parte externa de los cloroplastos. Debido a lo cual, no existe la posibilidad de contacto entre el almidón y la proteína.



X. PERSPECTIVAS

Para esclarecer la importancia fisiológica de la subunidad AKIN β 2 se propone evaluar la capacidad de unión a carbohidratos presentes en el citoplasma como monosacáridos y disacáridos. Se propone incluir ensayos de unión al heteroglucano soluble en agua (SHG, water-soluble heteroglycan) que resulta, indirectamente, de la degradación del almidón y a la maltosa.

Con base en la presunta localización nuclear de la subunidad AKIN β 2, se sugiere comprobar la presencia de esta a través de ensayos bioquímicos similares a los realizados en este trabajo. Además, de la localización conjunta de las subunidades que pueden ser acarreadas por la proteína AKIN β 2 al núcleo y su importancia fisiológica.

De manera comparativa, es importante obtener a la proteína recombinante AKIN β 1 y realizar los ensayos de unión al almidón que ya fueron presentados, empleando los mismos tipos de almidón y las mismas condiciones. También es necesario determinar si existen diferencias en la localización de ambas subunidades y establecer, de igual manera, la relevancia fisiológica.



XI. ANEXO

1. Extracción de cloroplastos

La extracción de cloroplastos de hojas de *A. thaliana* requiere de la utilización de varios Buffers. A continuación se describe el método de preparación de las soluciones necesarias.

1.1. Buffer Xpl (Homogenization Buffer)

Reactivos:

- 30mM Sorbitol
- 50mM HEPES-KOH pH 7.5
- 4mM MgCl₂
- Agua destilada

* Nota: El Buffer Xpl existe en dos formas: con BSA (Xpl-BSA) y sin BSA (Xpl). Para la preparación del primero, se deben agregar 0.25% de BSA y 0.1% de ácido ascórbico al Buffer Xpl estéril.

1.2. Gradientes de separación (Percoll 40% y Percoll 80%)

Tabla 2. Preparación del gradiente de separación para la extracción de cloroplastos.

	Percoll 80%	Percoll 40%
PBF Percoll	5mL	8mL
Agua destilada	---	7.6mL
0.5M EDTA pH 8	25μL	80μL
2M MgCl ₂	4.1μL	20μL
1M MnCl ₂	8.2μL	20μL
1M HEPES-KOH pH 7.5	312μL	1mL
2M Sorbitol	1mL	3.3mL

- Preparar por separado y agitar hasta obtener una mezcla homogénea.



1.3. PBF Percoll

Reactivos

- 450mg PEG 4000
- 150mg BSA
- 150mg Ficoll
- 15mL Percoll

- Los reactivos sólidos se deben disolver en el Percoll que debe ser abierto en la campana de flujo laminar para evitar contaminaciones.

2. Extracción de almidón

2.1. Percoll 95%

Reactivos

- 14.25mL Percoll
- 0.75mL 0.5M HEPES-KOH pH 7.0

3. Preparación de células competentes

Reactivos

- Solución CaCl₂ para células competentes
60mM CaCl₂
10mM PIPES (Piperazina-N,N"-bis[ácido 2-etanosulfónico])
15% Glicerol

- Sembrar una colonia en 50mL de medio LB en un matraz de 250mL. Dejar crecer durante toda la noche a 37°C con agitación.
- Inocular con 5mL de cultivo 400mL de medio LB en un matraz de 2L. Dejar crecer a 37°C con agitación hasta una D.O.₆₀₀ de 0.375.
- Vaciar el cultivo en 4 tubos grandes estériles e incubar en hielo de 5 a 10 min.
- Centrifugar a 2000xg durante 10min a 4°C. Resuspender cada botón en 20mL de solución para células competentes.



- Repetir la centrifugación. Resuspender nuevamente cada pastilla en 20mL de solución para células competentes y juntar las fracciones en un solo tubo. Incubar en hielo durante 30min.
- Volver a centrifugar. Resuspender el botón en 2.5mL de la solución para células competentes.
- Tomar alícuotas de 100µL en tubos Eppendorf estériles y congelar en nitrógeno líquido. Almacenar a -70°C.

4. Transformación de células competentes

- Descongelar una alícuota de células competentes en hielo.
- Agregar 1-3µL de plásmido en condiciones de esterilidad e incubar en hielo durante 30min.
- En un baño de agua a 42°C, colocar las células durante 45s. Inmediatamente después, incubarlas en hielo durante 2min.
- Agregar medio SOC hasta tener un volumen final de 500µL
- Incubar a 37°C durante 2h en agitación (250rpm)
- Centrifugar las células a 400xg durante 5min. Resuspender cuidadosamente en 100µL medio LB.
- Sembrar el cultivo en placas de medio con el antibiótico correspondiente e incubar durante toda la noche a 37°C.

5. Purificación del plásmido (Sigma-Aldrich GenElute™ Plasmid Miniprep Kit)

- Crecer una colonia bacteriana en 5mL medio LB a 37°C durante toda la noche en agitación.
- Trasferir el cultivo a un tubo Eppendorf nuevo. Centrifugar a 14000xg durante 1 min. Realizar varios pasos de centrifugación según el volumen del cultivo.
- Resuspender perfectamente las células en 200µL de Buffer de Resuspensión. Hacerlo con ayuda de una micropipeta.
- Lisar las células agregando 200µL de Buffer de Lisis. Mezclar inmediatamente invirtiendo el tubo 6 veces. No exceder de 5min la incubación con el Buffer de Lisis.



- Agregar al lisado 350µL de Buffer de Neutralización. Mezclar por inversión cuidadosamente. Centrifugar a 14000xg durante 10min para separar los restos celulares.
- Mientras tanto, insertar una columna (Gen Elute Miniprep Binding Column) en un tubo Eppendorf nuevo de 2mL. Agregar 500µL del Buffer de Preparación de Columna. Centrifugar a 14000xg durante 1min. Eliminar el sobrenadante.
- Transferir el sobrenadante del paso de neutralización a la columna preparada en el paso anterior. Centrifugar a 14000xg durante 1min. Eliminar el sobrenadante.
- Lavar con 750µL de la Solución de Lavado (Wash Solution). Centrifugar a 14000xg durante 1min. Eliminar el sobrenadante. Repetir la centrifugación.
- Transferir la columna a un tubo nuevo. Para eluir el DNA, agregar 30-50µL de Buffer de Elución (Elution Buffer) o Agua desionizada caliente (60°C).

6. Ensayos con DNA

6.1. Buffers de reacción para las enzimas de restricción XhoI/EcoRI/EcoRV

Tabla 3. Composición de los Buffers empleados en la restricción.

XhoI (NewEngland Biolabs)	EcoRI/EcoRV (Invitrogen)
Buffer 4 (1x)	Buffer H (1x)
50mM Acetato de potasio	50mM Tris-HCl pH 7.5
20mM Tris-HCl pH 7.9	50mM NaCl
10mM Acetato de magnesio	10mM MgCl ₂
1mM Ditioneitol (DTT)	1mM Ditioneitol (DTT)

6.2. Buffers de reacción para la amplificación del cDNA

Tabla 4. Composición del Buffer empleado para la amplificación con la enzima *Taq* Polimerasa.

OneTaq DNA Polymerase
Standard Taq Reaction Buffer (1x)
50mM KCl
10mM Tris-HCl pH 8.3
1.5mM MgCl



X. BIBLIOGRAFIA

- Alderson, A., Sabelli, P. A., Dickinson, J. R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Halford, N. G. (1991). Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(19), 8602–5.
- Andriotis, V. M. E., Pike, M. J., Kular, B., Rawsthorne, S., & Smith, A. M. (2010). Starch turnover in developing oilseed embryos. *The New Phytologist*, 187(3), 791–804.
- Avila-Castañeda, A., Gutiérrez-Granados, N., Ruiz-Gayosso, A., Sosa-Peinado, A., Martínez-Barajas, E., & Coello, P. (2014). Structural and functional basis for starch binding in the SnRK1 subunits AKIN β 2 and AKIN β γ . *Frontiers in Plant Science*, 5(May), 199.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, 448(7156), 938–42.
- Baena-González, E., & Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends in Plant Science*, 13(9), 474–82.
- Carling, D., Aguan, K., Woods, A., Verhoeven, A. J., Beri, R. K., Brennan, C. H., Scott, J. (1994). Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(15), 11442–8.
- Celenza, J. L., & Carlson, M. (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 233(4769), 1175–80.
- Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S. C., Smith, A. M. (2004). A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 37(6), 853–63.
- Coello, P., Hey, S. J., & Halford, N. G. (2011). The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *Journal of Experimental Botany*, 62(3), 883–93.
- Crozet, P., Jammes, F., Valot, B., Ambard-Bretteville, F., Nessler, S., Hodges, M., Thomas, M. (2010). Cross-phosphorylation between Arabidopsis thaliana sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(16), 12071–7.
- Fettke, J., Chia, T., Eckermann, N., Smith, A., & Steup, M. (2006). A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on



- cytosolic heteroglycans (SHG). *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 46(4), 668–84.
- Fettke, J., Eckermann, N., Tiessen, A., Geigenberger, P., & Steup, M. (2005). Identification, subcellular localization and biochemical characterization of water-soluble heteroglycans (SHG) in leaves of *Arabidopsis thaliana* L.: distinct SHG reside in the cytosol and in the apoplast. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 43(4), 568–85.
- Fujita, M., Torigoe, K., Nakada, T., Tsusaki, K., Kubota, M., Sakai, S., & Tsujisaka, Y. (1989). Cloning and nucleotide sequence of the gene (amyP) for maltotetraose-forming amylase from *Pseudomonas stutzeri* MO-19. *Journal of Bacteriology*, 171(3), 1333–9.
- Ghillebert, R., Swinnen, E., Wen, J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., ... Winderickx, J. (2011). The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *The FEBS Journal*, 278(21), 3978–90.
- Gissot, L., Polge, C., Bouly, J.-P., Lemaitre, T., Kreis, M., & Thomas, M. (2004). AKINbeta3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic beta-subunits. *Plant Molecular Biology*, 56(5), 747–59.
- Gissot, L., Polge, C., Jossier, M., Girin, T., Bouly, J.-P., 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 Physiology*, 142(3), 931–44.
- Guérinier, T., Millan, L., Crozet, P., Oury, C., Rey, F., Valot, B., Glab, N. (2013). Phosphorylation of p27(KIP1) homologs KRP6 and 7 by SNF1-related protein kinase-1 links plant energy homeostasis and cell proliferation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 75(3), 515–25.
- Gutiérrez-Granados, N. (2008). *EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SUBUNIDAD AKIN βγ*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Halford, N. G., & Hey, S. J. (2009). Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *The Biochemical Journal*, 419(2), 247–59.
- Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(10), 774–85.
- Harthill, J. E., Meek, S. E. M., Morrice, N., Pegg, M. W., Borch, J., Wong, B. H. C., & Mackintosh, C. (2006). Phosphorylation and 14-3-3 binding of *Arabidopsis* trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 47(2), 211–23.



- Hedbacker, K., Townley, R., & Carlson, M. (2004). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates the subcellular localization of Snf1-Sip1 protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 24(5), 1836–43.
- Janeček, Š., Svensson, B., & MacGregor, E. A. (2011). Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals. *Enzyme and Microbial Technology*, 49(5), 429–40.
- Kozlov, S. S., Blennow, A., Krivandin, A. V., & Yuryev, V. P. (2007). Structural and thermodynamic properties of starches extracted from GBSS and GWD suppressed potato lines. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40(5), 449–60.
- Lo, H.-F., Lin, L.-L., Chiang, W.-Y., Chie, M.-C., Hsu, W.-H., & Chang, C.-T. (2002). Deletion analysis of the C-terminal region of the alpha-amylase of *Bacillus* sp. strain TS-23. *Archives of Microbiology*, 178(2), 115–23.
- 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, M. M., Kleinow, T., Koncz, C., & Pagès, M. (2001). Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Reports*, 2(1), 55–60.
- McBride, A., Ghilagaber, S., Nikolaev, A., & Hardie, D. G. (2009). The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metabolism*, 9(1), 23–34. R
- Mikami, B., Adachi, M., Kage, T., Sarikaya, E., Nanmori, T., Shinke, R., & Utsumi, S. (1999). Structure of raw starch-digesting *Bacillus cereus* beta-amylase complexed with maltose. *Biochemistry*, 38(22), 7050–61.
- Nunes, C., Primavesi, L. F., Patel, M. K., Martinez-Barajas, E., Powers, S. J., Sagar, R., Paul, M. J. (2013). Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 63, 89–98.
- Oakhill, J. S., Chen, Z.-P., Scott, J. W., Steel, R., Castelli, L. a, Ling, N., Kemp, B. E. (2010). β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), 19237–41.
- Pierre, M., Traverso, J. A., Boisson, B., Domenichini, S., Bouchez, D., Giglione, C., & Meinel, T. (2007). N -Myristoylation Regulates the SnRK1 Pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(September), 2804–2821.



- Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B. J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S. C., Stapleton, D. (2003). AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Current Biology : CB*, 13(10), 867–71.
- Polekhina, G., Gupta, A., van Denderen, B. J. W., Feil, S. C., Kemp, B. E., Stapleton, D., & Parker, M. W. (2005). Structural basis for glycogen recognition by AMP-activated protein kinase. *Structure (London, England : 1993)*, 13(10), 1453–62.
- Polge, C., & Thomas, M. (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends in Plant Science*, 12(1), 20–8.
- Radchuk, R., Emery, R. J. N., Weier, D., Vigeolas, H., Geigenberger, P., Lunn, J. E., Weber, H. (2010). Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 61(2), 324–38.
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Baena-González, E. (2013). ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(10), 3871–84.
- Rolland, F., Moore, B., & Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell*, 14 Suppl, S185–205.
- Sakoda, H., Fujishiro, M., Fujio, J., Shojima, N., Ogihara, T., Kushiya, A., Asano, T. (2005). Glycogen debranching enzyme association with beta-subunit regulates AMP-activated protein kinase activity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 289(3), E474–81.
- Schluepmann, H., Berke, L., & Sanchez-Perez, G. F. (2012). Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63(9), 3379–90.
- Shen, W., Reyes, M. I., & Hanley-Bowdoin, L. (2009). Arabidopsis protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiology*, 150(2), 996–1005.
- Shure, M., Wessler, S., & Fedoroff, N. (1983). Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell*, 35(1), 225–33. Retrieved from
- Steinberg, G. R., & Kemp, B. E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 89(3), 1025–78.
- Streb, S., & Zeeman, S. C. (2012). Starch metabolism in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 10, e0160. <http://doi.org/10.1199/tab.0160>



- Svensson, B., Larsen, K., Svendsen, I., & Boel, E. (1983). The complete amino acid sequence of the glycoprotein, glucoamylase G1, from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Research Communications*, 48(6), 529–544.
- Tetlow, I. J., Wait, R., Lu, Z., Akkasaeng, R., Bowsher, C. G., Esposito, S., ... Emes, M. J. (2004). Protein phosphorylation in amyloplasts regulates starch branching enzyme activity and protein-protein interactions. *The Plant Cell*, 16(3), 694–708.
- Tsai, C. Y. (1974). The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. *Biochemical Genetics*, 11(2), 83–96.
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., & Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes & Development*, 15(9), 1104–14.
- Wingler, A., Masclaux-Daubresse, C., & Fischer, A. M. (2009). Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1063–6.
- Wojtaszewski, J. F. P., Jørgensen, S. B., Hellsten, Y., Hardie, D. G., & Richter, E. A. (2002). Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes*, 51(2), 284–92.
- Zeeman, S. C., Thorneycroft, D., Schupp, N., Chapple, A., Weck, M., Dunstan, H., Smith, S. M. (2004). Plastidial alpha-glucan phosphorylase is not required for starch degradation in *Arabidopsis* leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress. *Plant Physiology*, 135(2), 849–58.
- Zhang, Y., Shewry, P. R., Jones, H., Barcelo, P., Lazzeri, P. A., & Halford, N. G. (2001). Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 28(4), 431–41.