



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**Fosforilación y activación del dominio catalítico de la
cinasa SnRK1 de *Arabidopsis thaliana***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ROBERTO ALFREDO SÁENZ HERNÁNDEZ



Ciudad Universitaria, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI

VOCAL: Profesor: DR. JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ

SECRETARIO: Profesor: DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

1er. SUPLENTE: Profesor: DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

2° SUPLENTE: Profesor: DRA. FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Beatriz Alejandra Ávila Castañeda

SUSTENTANTE:

Roberto Alfredo Sáenz Hernández

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABERVIATURAS	iv
1 RESUMEN.....	1
2 INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Percepción y señalización de estrés y energía	2
2.2 La familia conservada SNF1/AMPK/SnRK1 es un regulador maestro de la homeostasis energética	2
2.3 La estructura y función de los complejos SNF1/AMPK/SnRK1	6
2.3.1 La subunidad catalítica α	7
2.3.2 Las subunidades β	8
2.3.3 La subunidad γ	9
2.3.4 La subunidad $\beta\gamma$ específica de plantas.....	9
2.4 Las vías de señalización son reguladas por eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas en los que participan cinasas y fosfatasas.	10
2.5 Regulación de la actividad de SnRK1	12
2.5.1 Fosforilación-desfosforilación del complejo SnRK1.....	12
2.5.2 Regulación por metabolitos	12
2.5.3 Regulación por otras modificaciones post-traduccionales.....	13
2.6 Conservación de las cinasas activadoras	13
2.7 Las cinasas SnAK1 y 2, actores claves en la vía de señalización SnAK/SnRK1	15
3 ANTECEDENTES.....	17
4 HIPÓTESIS	19
5 OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos particulares	19
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 Materiales.....	20
6.1.1 Reactivos generales	20
6.1.2 Enzimas y amortiguadores	21
6.1.3 Plásmidos vectores y construcciones	21
6.1.4 Cepas bacterianas.....	21

6.2	Amplificación de cDNA	22
6.3	Electroforesis en gel de agarosa.....	22
6.4	Construcción de plásmidos	23
6.5	Obtención de proteína recombinante.....	24
6.6	Cuantificación de proteína recombinante por el método de Bradford.....	25
6.7	Electroforesis en gel desnaturizante (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, SDS-PAGE).....	25
6.8	Tinción con Coomassie coloidal.....	25
6.9	Detección de proteínas por western blot.....	25
6.10	Ensayos de activación de SnRK1	26
6.11	Ensayos de actividad sobre péptido AMARA	26
6.12	Determinación de residuos fosforilados por MS.....	27
6.13	Phos-tag SDS-PAGE.....	27
7	RESULTADOS	28
7.1	Obtención y clonación del cDNA codificante para los dominios catalíticos en el vector de expresión pGEX-4T-2	28
7.2	Obtención y purificación de las proteínas recombinantes	30
7.3	Ensayos de activación de SnRK1	32
7.4	Ensayos de actividad sobre el péptido AMARA	34
7.5	Determinación de residuos fosforilados por espectrometría de masas	35
7.6	Determinación de grados de fosforilación mediante Phos-tag SDS-PAGE	37
8	DISCUSIÓN.....	38
9	CONCLUSIONES	42
10	PERSPECTIVAS	43
11	REFERENCIAS	44

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PROGRAMA DE TEMPERATURA Y TIEMPO DE PCR	22
TABLA 2. ENSAYOS DE CINASA IN VITRO	26
TABLA 3. PROPORCIONES DE REACTIVOS PARA GELES SDS-PAGE.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto global de la respuesta de SnRK1 ante estrés en plantas.....	5
Figura 2. Estructuras de las subunidades de los complejos SNF1/AMPK/SnRK1.	10
Figura 3. Modificación covalente de una enzima regulada por fosforilación-desfosforilación de un residuo de serina (Ser).....	11
Figura 4. Fosforilación de los dominios catalíticos sobre un residuo conservado en región denominada asa de activación en los eucariontes.	14
Figura 5. Mecanismo propuesto de interacción por fosforilaciones entre la cinasa SnRK1 y su cinasa activadora SnAK1.	16
Figura 6. Los niveles de fosforilación de las cinasas AMPK pero no los de la SnRK1 son relacionados a su activación por estrés.	17
Figura 7. Captura de pantalla de PhosPhAt 4.0 para predicción de sitios fosforilables en SnRK1.1.. ..	18
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR purificados.....	28
Figura 9 Selección de colonias blancas/azules.....	29
Figura 10. Purificación de insertos para clonar en pGEX.	30
Figura 11. Linearización y purificación del vector pGEX-4-T-2.....	30
Figura 12 Purificación de las proteínas recombinantes.	31
Figura 13 Purificación de las proteínas recombinantes.....	32
Figura 14 Corroboración de las proteínas purificadas mediante western blot.	32
Figura 15 Fosforilación in vitro de dominios catalíticos SnRK1 por la cinasa activadora SnAK2... ..	33
Figura 16. Actividad cinasa de los dominios catalíticos.....	34
Figura 17. Visualización de resultados de tripsinización y análisis por MS.....	36
Figura 18 Grados de fosforilación de los dominios catalíticos.	37

LISTA DE ABERVIATURAS

% p/v	porcentaje peso volumen
% v/v	porcentaje volumen-volumen
° C	grados Centigrado
ABA	ácido abscísico
AID	dominos auto inhibición
AKIN10	Arabidopsis cinasa 10, ver SnRK1.1
AKIN11	Arabidopsis cinasa 11, ver SnRK1.2
AMARA	péptido AMARA (N-AMARAASAAALARRR-C
AMP	monofosfato de adenosina
AMPK	cinasa activada por AMP
ASC	dominio de asociación con SNF1
ATP	trifosfato de adenosina
BSA	albúmina de suero bovino
bZIP	factores de transcripción cremallera de leucina básica del inglés basic Leucine Zipper Domain
CBS	cistation-β-sintasa
cDNA	ADN complementario
CTD	dominio de asociación de la cinasa
DNA	ácido desoxiribonucleico
dNTPs	nucleotidos tri-fosfato
DO _{600nm}	Densidad óptica a 600 nm
DTT	ditiotreitól
E. coli	Escherichia coli
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EtBr	bromuro de etidio
EtOH	etanol
GBD	dominio de unión a glucógeno
GRIK1	cinasa interactiva con Rep de Geminivirus 1, ver SnAK2
GRIK2	cinasa interactiva con Rep de Geminivirus 2, ver SnAK1
GST	Glutación S-transferasa
h	hora(s)
HEPES	ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HMGCoAR	3-hidroxil-3-metilglutaril conenzima-A reductasa
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
KA1	dominio asociado a cinasa
KCl	cloruro de potasio
LB	Caldo de Luria
MeOH	metanol
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	minutos
NaCl	Cloruro de sodio
NaCOOH	Acetato de sodio
NaF	Fluoruro de sodio

NaH ₂ PO ₄	Fosfato monosódico
NaOH	Hidróxido de sodio
NR	nitrato reductasa
OH	Hidroxilo
pb	pares de bases
PBST	amortiguador fosfato salino con tween
PCR	reacción de la polimerasa en cadena
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PP2C	fosfatasas de proteínas tipo dos
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RNA _m	RNA mensajero
s	segundos
SBD	dominio de unión a almidón
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SnAK1	cinasa activadora de SnRK1
SnAK2	cinasa activadora de SnRK1
SNF1	no-fermentadora de glucosa 1
SnRK1	cinasa relacionada a Snf1
SnRK1.1 DC	Dominio catalítico de SnRK1.1
SOS2	hipersensible a sal 2 del inglés Salt Overly Sensitive 2
SPS	sacarosa fosfato sintasa
SPS	persulfato de amonio
T	Treonina
T6P	trealosa-6-fosfato
Thr	Treonina
U	Unidades enzimáticas
UBA	dominio de unión a proteínas ubiquitinadas
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria
V	Volteos
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
λ	longitud de onda

1 RESUMEN

Todos los organismos tienen la necesidad de monitorear la disponibilidad de carbono y energía para sobrevivir; una afirmación especialmente verdadera para las plantas debido a la necesidad de integrar las inevitables condiciones ambientales desfavorables con el metabolismo para mantener la homeostasis celular. En eucariontes, existe un mecanismo conservado que involucra una familia de serina/treonina cinasas que actúan como integradores centrales de señales de estrés y regulación del balance energético. Este sensor molecular es activado por niveles disminuidos de nutrientes y responde regulando positivamente procesos conservativos de energía y disminuyendo los procesos que conducen a un gasto energético y en plantas se conoce como el complejo heterotrimérico SnRK1.

La fosforilación de proteínas es una modificación post-transcripcional ampliamente utilizada por la célula para controlar la actividad de proteínas, su interacción con otras proteínas, tasa de recambio, y localización subcelular. Se ha propuesto previamente un modelo sobre la interacción entre las cinasas SnRK1 y sus proteínas cinasas activadoras. El modelo actualmente aceptado describe la fosforilación de la SnRK1 sobre el residuo Thr175 para conferirle actividad de cinasa (Crozet *et al.*, 2010)

El presente trabajo aborda la regulación por la fosforilación del integrador metabólico central SnRK1 exponiendo evidencia de novedosos sitios fosforilables *in vitro*. Estudiando la actividad de los dominios catalíticos de la cinasa SnRK1 por fosforilación de su cinasa activadora SnAK así como por mutagénesis fosfomimética los resultados indican que la cinasa activadora actúa sobre los dos dominios catalíticos de manera distinta. Así mismo, la fosforilación de los dominios catalíticos produce niveles altos de actividad sobre un péptido blanco, aunque distintos, para SnRK1.1 y SnRK1.2. A pesar de esto, la activación constitutiva de las subunidades catalíticas no se pudo lograr por una mutación fosfomimética sobre el residuo necesario para la activación de la cinasa. Sorprendentemente, la cinasa activadora es capaz de incorporar ATP marcado radiactivamente sobre las proteínas mutadas, lo que hace evidente la existencia de un sitio fosforilable adicional. Así mismo, la determinación de modificaciones post-traduccionales de los dominios catalíticos mediante espectroscopia de masas reveló un residuo fosforilado sobre SnRK1.1 el cual no se había descrito previamente. Sería interesante determinar si existen otros sitios fosforilables y su papel funcional en la actividad de la cinasa SnRK1.

2 INTRODUCCIÓN

De una u otra manera, cualquier ser viviente debe mantener sus niveles energéticos en homeostasis y adaptarse rápidamente a condiciones ambientales desfavorables o de lo contrario, perecer. Todos los seres vivos han desarrollado sistemas para medir su disponibilidad energética ante fluctuaciones de nutrientes y desencadenar las respuestas necesarias para sobrevivir. En eucariontes, existe un mecanismo conservado que involucra una familia de serina/treonina cinasas que actúan como integradores centrales de señales de estrés y regulación del balance energético. Este sensor molecular es activado por falta de nutrientes y condiciones de baja energía protegiendo a la célula mediante la reprogramación del metabolismo; en conjunto se denomina la familia de proteínas cinasas **SNF1/AMPK/SnRK1** (ver primer párrafo de 2.2).

2.1 Percepción y señalización de estrés y energía

Las plantas, como el resto de los seres vivos, se enfrentan a una variedad de formas de estrés que afectan de manera negativa su estado global energético durante su ciclo de vida. Una variedad de factores –tanto ambientales como biológicos– pueden ser percibidos como estrés. La carencia de nutrientes puede ser percibida como estrés. El déficit energético resultante se asocia habitualmente a una reducción en la tasa de fotosíntesis y/o respiración, lo que resulta en una limitación energética y consecuentemente en la detención de crecimiento y muerte celular (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007). Las respuestas ante estrés en plantas involucran la modulación de transcripción genética y en algunos casos este cambio en regulación transcripcional puede llegar a tener efectos globales (Baena-Gonzalez y Sheen, 2008).

El complejo enzimático SnRK1 dirige la regulación de la respuesta a condiciones de bajos niveles energéticos y se considera un decodificador central de múltiples señales (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007).

2.2 La familia conservada SNF1/AMPK/SnRK1 es un regulador maestro de la homeostasis energética

Las cinasas: no-fermentadora de glucosa 1 (**SNF1** del inglés Sucrose non-fermenting1) de levaduras, cinasa activada por AMP (**AMPK** del inglés AMP activated protein kinase) de mamíferos, y la cinasa relacionada a Snf1 (**SnRK1** del inglés Snf1-related kinase1) de plantas; actúan como reguladores globales del metabolismo de carbono y se han

conservado evolutivamente. Estas cinasas desempeñan su papel reprogramando el metabolismo de la célula en respuesta a niveles bajos de energía promoviendo vías catabólicas que producen energía e inhibiendo aquellas vías anabólicas que consumen energía (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007; Emanuelle *et al.*, 2015).

El miembro ortólogo en levaduras, la cinasa SNF1, se identificó en *Saccharomyces cerevisiae* en 1981 con el estudio de mutantes incapaces de utilizar sacarosa como fuente energética (Carlson *et al.*, 1981). Para esta levadura, la glucosa es la fuente preferencial de carbono y en su ausencia la SNF1 regula positivamente genes involucrados en el metabolismo de fuentes alternas de carbono; por lo cual, es vital para la respuesta a inanición de glucosa (Carlson *et al.*, 1981; Gancedo, 1998).

En 1994 se clonó el cDNA de la subunidad catalítica de la AMPK y se identificó como el ortólogo de Snf1 en mamíferos poniendo en evidencia la similitud entre ambas enzimas (Woods *et al.*, 1994). La AMPK es activada en condiciones que incrementan la relación AMP/ATP como: la inanición de glucosa, hipoxia, isquemia, o estrés oxidativo. Para reestablecer la homeostasis metabólica, la AMPK incrementa el metabolismo catabólico que produce energía –tal como la glicólisis y oxidación de ácidos grasos- y reduce vías del metabolismo anabólico que consumen energía como la síntesis de proteínas, esteroides y ácidos grasos (Hardie, 2007). Así mismo, integra señales nutricionales y hormonales en el hipotálamo para controlar el consumo de alimentos y peso corporal o inhibe producción de insulina en respuesta a niveles bajos de glucosa (da Silva Xavier *et al.*, 2003; Minokoshi *et al.*, 2008). En humanos, esto se traduce en un impacto muy grande en el crecimiento, el desarrollo, y la supervivencia; ante la desregulación se llegan a desarrollar una variedad de enfermedades, desde síndrome metabólico, resistencia a la insulina, obesidad, enfermedades cardiovasculares, y patologías relacionadas con la vejez como el cáncer, demencia, e infarto (Mair *et al.*, 2011; Steinberg y Kemp, 2009).

La SnRK1 es el homólogo en plantas de la SNF1 de levaduras y AMPK de mamíferos (Halford *et al.*, 2003). Este miembro se identificó por primera vez cuando su RNAm se aisló del endospermo de centeno y se demostró que el cDNA complementaba al mutante *Snf1* en levaduras (Alderson *et al.*, 1991). Otros ortólogos de la SnRK1 han sido caracterizados desde entonces en varias especies de plantas (Halford y Hardie, 1998).

La SnRK1 es un sensor metabólico capaz de decodificar señales de deficiencia energética y a la vez inducir una reprogramación metabólica como parte de la respuesta de adaptación a estrés. Estudios sobre la enzima SnRK1 revelan que las plantas inician una

reprogramación transcripcional masiva en respuesta a un estado de deficiencia nutrimental. Perfiles transcriptómicos en *Arabidopsis thaliana* revelan que el efecto de inanición de azúcar u obscuridad prolongada afecta a más de mil genes blanco, así como deficiencia energética promovida por deficiencia de fosfato (Baena-Gonzalez y Sheen, 2008). Esta respuesta involucra la activación de procesos redistributivos de energía tales como el catabolismo de amino ácidos e hidrólisis de sacarosa. Modificaciones metabólicas y estructurales promovidas por un déficit energético se acompañan por cambios en expresión génica. Todo esto es mediado por un gran número de factores de transcripción y blancos río abajo que inician un programa de ahorro energético a distintos niveles involucrando la transcripción, traducción, o fosforilación directa de blancos proteicos (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007)(**Figura 1**).

La identificación de sustratos de SnRK1 en plantas y genes regulados asentó la primera evidencia de que estas proteínas cinasas están involucradas en el control de metabolismo de carbono y nitrógeno en plantas. La regulación de expresión genética no se restringe a unos cuantos genes. Se informó que la activación de SnRK1 desencadena cambios en la expresión de más de mil genes que permiten el restablecimiento de la homeostasis metabólica (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007). Hasta hace poco sólo unos cuantos de los componentes de la cascada de SnRK1 involucrada en la regulación genética habían sido identificados. De particular importancia es el grupo de factores de transcripción cremallera de leucina básica (bZIP, del inglés basic Leucine Zipper Domain) que se unen a los promotores de genes regulados por la vía de SnRK1.1 (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007; Hanson *et al.*, 2008). Interesantemente, estos factores de transcripción se reprimen por azúcares, lo que está en acuerdo con el concepto de regulación antagonista de la regulación del sistema por deficiencia de energía y abundancia de energía (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007).

Históricamente, los hallazgos de enzimas reguladas por la SnRK1 en *Arabidopsis* se han llevado a cabo mediante fosforilaciones *in vitro* de candidatos individuales. Tal es el caso de las enzimas 3-hidroxil-3-metilglutaril conenzima-A reductasa (HMGCoAR), la sacarosa fosfato sintasa (SPS) y la nitrato reductasa (NR), involucradas en síntesis de isoprenoides, biosíntesis de sacarosa y asimilación de nitrógeno, respectivamente; que se ha demostrado son fosforiladas e inactivadas por la SnRK1 *in vitro* (Halford *et al.*, 2003; Rolland y Sheen, 2005). Avances tecnológicos más recientes, ahora permiten estudiar fosfoproteomas completos y descubrir sustratos de enzimas reguladoras a gran escala. Al respecto, un

estudio de fosfoproteómica cuantitativo en el que se estudian plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes *snrk1.1/snrk1.2* en ausencia de luz comprueba el papel de la SnRK1 *in vivo* como regulador central de la homeostasis energética en plantas al ajustar el metabolismo durante un estado de baja energía mediante la fosforilación de blancos específicos antes sólo demostrado *in vitro* (Nukarinen, *et al.*, 2016)

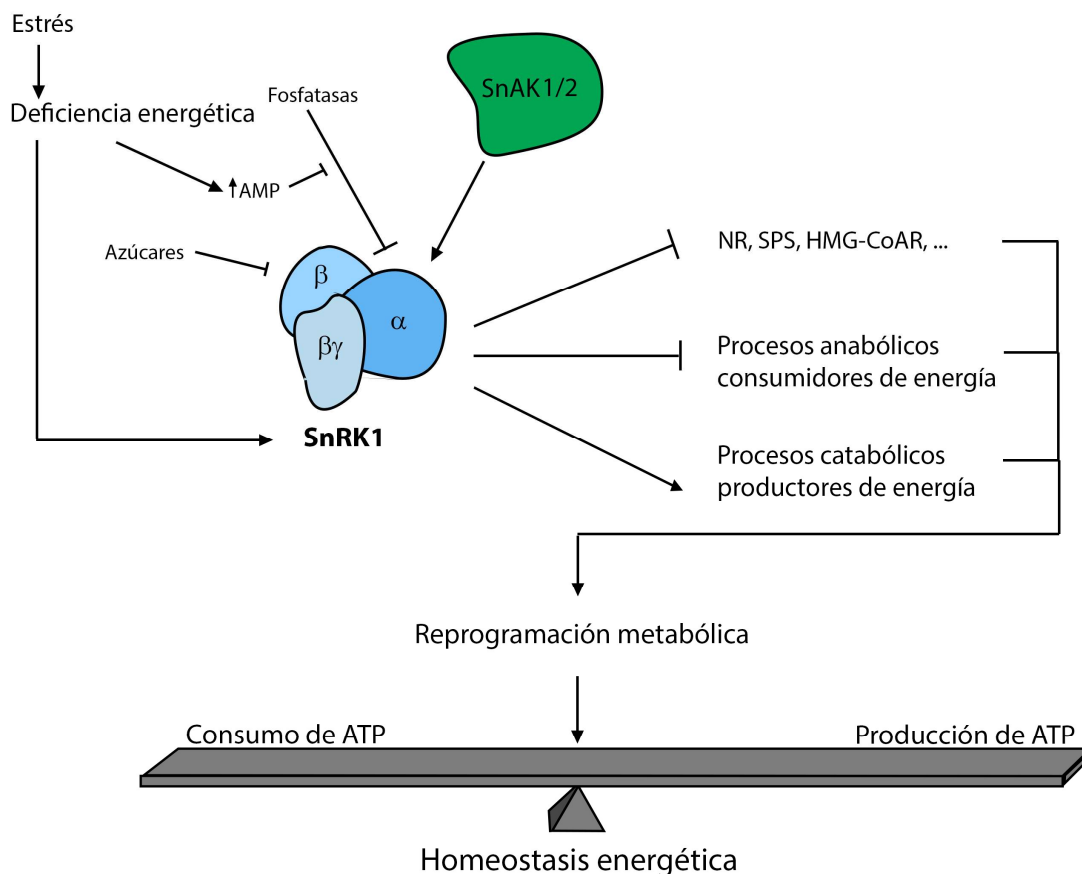


Figura 1. Efecto global de la respuesta de SnRK1 ante estrés en plantas. Resumen simplificado del papel central del complejo SnRK1 en el balance energético mediante la reprogramación metabólica. Flechas indican regulación positiva o negativa (revisado en Polge y Thomas, 2007).

Por otro lado, la caracterización de plantas transgénicas y mutantes de SnRK1 ha revelado información importante sobre la función fisiológica de estas cinasas en el crecimiento y desarrollo. Plantas transgénicas que sobre-expresan SnRK1.1 resultan en senescencia y floración retrasada, desarrollo de flor alterada, y mayor tolerancia a condiciones de inanición de nutrientes, esto concuerda con el papel de SnRK1.1 en la respuesta a estrés (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007). Así mismo, el silenciamiento de SnRK1.1 ó SnRK1.2 le impide el crecimiento a la planta y le induce senescencia antes de la floración.

En plantas existen otras dos subfamilias relacionadas con la SnRK1, la familia de las cinasas SnRK2 y SnRK3 que son menos similares a la SNF1 y AMPK, y son exclusivas de plantas (Halford *et al.*, 2003). Se ha propuesto que las SnRK2 y SnRK3 surgieron en plantas por la duplicación génica de SnRK1 y rápidamente divergieron durante la evolución de plantas para relacionar redes que ligan a la señalización del estrés y ácido abscísico (ABA) con la señalización metabólica, de una manera que no llega a ocurrir en otros organismos (Halford y Hey, 2009). Las cinasas de las familias SnRK2 y SnRK3 no complementan a la mutante *snf1* (Hrabak *et al.*, 2003), pero sí están involucradas en vías de señalización que regulan las respuestas en plantas a limitación de nutrientes, sequía, frío, estrés osmótico, y estrés salino y comparten algunas similitudes con la SnRK1 en cuanto a reconocimiento de blancos (Coello *et al.*, 2012; Halford *et al.*, 2004). La SnRK2 se relaciona con la señalización de ácido abscísico (ABA), respuestas al frío, estrés osmótico, y se ha demostrado que mejora la tolerancia a sequía cuando se sobre-expresa (Fujita *et al.*, 2009; Halford y Hey, 2009; Yoshida *et al.*, 2015). Estudios han demostrado que la inactivación de SnRK2.6 en *A. thaliana* resulta en síntesis reducida de aceites, mientras que su sobre-expresión incrementa la síntesis de sacarosa y desaturación de grasas en hojas, sugiriendo que la SnRK2.6 también podría encontrarse implicada en procesos metabólicos (Zheng *et al.*, 2010). La subfamilia SnRK3 incluye a la SnRK3.1, también conocida como la hipersensible a sal 2 (SOS2 del inglés Salt Overly Sensitive 2), que se involucra con la señalización a la tolerancia a estrés salino, y la SnRK3.1, un regulador global de la respuesta a ABA en un mecanismo de regulación negativa que controla sensibilidad a ABA (Guo *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2000). En *A. thaliana*, las (PP2C) regulan tanto a la subunidad catalítica de SnRK1 como a las de las SnRK2.2/2.3/2.6 (Rodrigues *et al.*, 2013).

2.3 La estructura y función de los complejos SNF1/AMPK/SnRK1

Los miembros de la familia SnRK1/SNF1/AMPK existen estructural y funcionalmente como complejos heterotriméricos y se conforman por una subunidad catalítica α y las subunidades reguladoras β y γ . En *A. thaliana* existen dos isoformas funcionales de la subunidad catalítica α : la SnRK1.1 y la SnRK1.2; tres subunidades β : β 1, β 2, y β 3; una subunidad γ y una subunidad atípica, específica de plantas, denominada $\beta\gamma$. De este modo, mientras la actividad cinasa del complejo está mediada por la subunidad α , todos los estudios sugieren que los otros componentes ejercen funciones reguladoras (revisado en Polge y Thomas, 2007).

2.3.1 La subunidad catalítica α

La subunidad α se conforma por un dominio catalítico amino- terminal y una región reguladora carboxilo- terminal. El dominio cinasa de las subunidades α es el más conservado entre distintas especies y muestra una importante similitud con otras cinasas; no obstante, la secuencia de subunidad α permanece específica en la familia SNF1/AMPK/SnRK1. Las subunidades catalíticas de los miembros de esta familia de cinasas incluyen una región denominada *asa de activación* altamente conservada con una treonina que permanece fosforilada mientras la cinasa está activa (revisado en Polge y Thomas, 2007).

Las secuencias de los dominos auto inhibición (AID, del inglés Auto Inhibitory Domain) de la Snf1 ya han sido caracterizados con precisión en levadura. Experimentos de deleciones permitieron localizar el AID en la posición de los aminoácidos 392-518 en la Snf1, que es casi idéntica a la secuencia de unión con la subunidad γ (392-495) (Jiang y Carlson, 1996). En mamíferos, el papel de un motivo pequeño inmediatamente río-abajo del dominio cinasa (313-335) se caracterizó en la AMPK de rata como una secuencia inhibitoria (Pang *et al.*, 2007). En la SnRK1, sobre la misma posición de la secuencia se encuentra un dominio de unión a proteínas ubiquitinadas (UBA, del inglés ubiquitin-associated domain) **Error! Reference source not found.** El dominio UBA es de aproximadamente 45 residuos y se pliega en un grupo de tres hélices, exponiendo una región hidrofóbica que generalmente interactúa con cadenas mono- o poli- ubiquitinadas (Hofmann y Bucher, 1996). La ubiquitinación tiene varias funciones en la célula: como señal de clasificación durante la endocitosis, como señal para la degradación proteasomal, transducción de señales, y reparación del DNA (Bertolaet *et al.*, 2001; Buchberger, 2002; Kang *et al.*, 2006; Ortolan *et al.*, 2000).

El extremo carboxilo- terminal (515-633) de la subunidad Snf1 en levaduras es responsable de la unión a la subunidad β , que también es indispensable para su actividad (Jiang y Carlson, 1997). En las subunidades catalíticas de *Arabidopsis*, el extremo carboxilo-terminal forma un dominio asociado a cinasa (KA1, del inglés Kinase associated domain 1) **Error! Reference source not found.** que se ha visto implicado en la auto-inhibición (Pang *et al.*, 2007).

El dominio cinasa de la subunidad catalítica de SnRK1 contiene al asa de activación altamente conservada, mientras que el dominio regulador alberga a un dominio el cual se

ha propuesto que regula la interacción con proteínas ubiquitinadas (Farras *et al.*, 2001). En mamíferos y levaduras, el dominio regulador parece tener una secuencia auto-inhibidora la cual se ha demostrado que inhibe la actividad cinasa, mientras que en plantas esto no se ha demostrado (Chen *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2007). El KA1 de la subunidad α también sirve como la región donde ocurre la interacción con la subunidad β y fosfatasa (Amodeo *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2011)

2.3.2 Las subunidades β

Las subunidades β funcionan como el andamiaje central de los complejos triméricos con distintos dominios de interacción en sus regiones carboxilo- terminal. En adición a sus funciones estructurales, las subunidades β determinan la localización sub-celular de los complejos por miristoilación (ver sección 2.4.4 y Error! Reference source not found.), y tienen papeles importantes en el reconocimiento selectivo de sustratos (Hedbacker y Carlson, 2008). Las subunidades β son esenciales para la función del heterotrimerio *in vivo*, ya que la delección de genes que codifican para todas las isoformas β inactiva a la cinasa Snf1 en levadura y conlleva al fenotipo *snf1*-.

En plantas, las subunidades tipo β contienen un dominio de unión a almidón (SBD, del inglés starch-binding domain), un dominio de asociación con SNF1 (ASC, del inglés association with the SNF1 complex), importante para la interacción entre las subunidades α y γ , y una extensión amino- terminal para facilitar la asociación con blancos río abajo (Hedbacker y Carlson, 2008). La subunidad β_3 solo contiene el dominio ASC, pero es capaz de complementar al mutante *gal83 Δ dsip1 Δ sip2 Δ* , que no tiene sus tres subunidades β , y se ha demostrado que puede formar complejos con las otras subunidades (Gissot *et al.*, 2004).

La subunidad β está involucrada en reconocimiento del sustrato, localización sub-celular y regulación de la actividad del complejo, tanto en plantas, mamíferos y levaduras (Ghillebert *et al.*, 2011; Polge y Thomas, 2007; Vincent *et al.*, 2001). Se ha demostrado que la SnRK1 es capaz de regular la actividad de la enzima nitrato reductasa (NR), siendo la subunidad SnRK1 β_1 la responsable de regular negativamente la actividad NR (Li *et al.*, 2009; Polge y Thomas, 2007). La expresión de SnRK1 β_1 también es regulada por el estado de nitrógeno en un mecanismo de regulación negativa (Li *et al.*, 2009). Interesantemente, en *A. thaliana* la SnRK1 β_1 , la SnRK1 β_2 , y la SnRK1 β_3 tienen patrones de expresión marcadamente distintos, lo que sugiere un nivel de regulación basado en interacciones que tienen como

blanco las distintas subunidades β en respuesta a señales específicas (Bouly *et al.*, 1999; Gissot *et al.*, 2004; Polge y Thomas, 2007).

2.3.3 La subunidad γ

La subunidad γ de SnRK1 contiene dos pares de repeticiones cistation- β -sintasa (CBS), que son dominios de unión de nucleótidos de adenina (Hedbacker y Carlson, 2008). Ni en los ortólogos de levaduras ni en plantas se ha demostrado la unión con AMP; sin embargo, el AMP promueve la actividad cinasa de SnRK1 mediante mecanismos indirectos (Adams *et al.*, 2004; Ghillebert *et al.*, 2011; Sugden *et al.*, 1999). Se ha propuesto que subunidades de este tipo no se encuentran formando parte del heterotrímero natural y la función de la subunidad γ la realiza la subunidad atípica $\beta\gamma$ (Emanuelle *et al.*, 2015).

2.3.4 La subunidad $\beta\gamma$ específica de plantas

Las plantas han adquirido un híbrido $\beta\gamma$ único. Funcionalmente se ha caracterizado como una subunidad γ , pero contiene homología amino-terminal con el SBD y cuatro motivos CBS en el extremo carboxilo. La subunidad $\beta\gamma$ complementa al mutante de la subunidad γ en levadura, interacciona con las subunidades α y γ en ensayos doble híbrido, y se ensambla para formar complejos específicos de SnRK1 en plantas (Bitrian *et al.*, 2011; Emanuelle *et al.*, 2015; Lopez-Paz *et al.*, 2009). Sorprendentemente, en plantas el híbrido $\beta\gamma$ de SnRK1 actúa como la subunidad canónica γ , siendo requerida para la formación de complejo con las subunidades α y β . Esta subunidad interacciona con cualquiera de las tres subunidades β , y la interacción depende del dominio CBS altamente conservado, pero no requiere el dominio SBD (Emanuelle *et al.*, 2015; Ramon *et al.*, 2013). El dominio SBD de la subunidad $\beta\gamma$ de SnRK1 muestra más similitud en secuencia al de la subunidad β de mamíferos que a la de las subunidades β de plantas (Lumbreras *et al.*, 2001; Ramon *et al.*, 2013).

Existen múltiples isoformas de las subunidades α , β , y γ ; razón por la cual se pueden formar distintos heterotrímeros. Por ejemplo, en plantas hay dos subunidades α , tres subunidades β y por lo menos dos subunidades tipo γ . Además, los transcritos de las subunidades Snf1/AMPK/SnRK1 pueden llevar a cabo splicing alternativo, aumentando las posibles variaciones (Steinberg y Kemp, 2009).

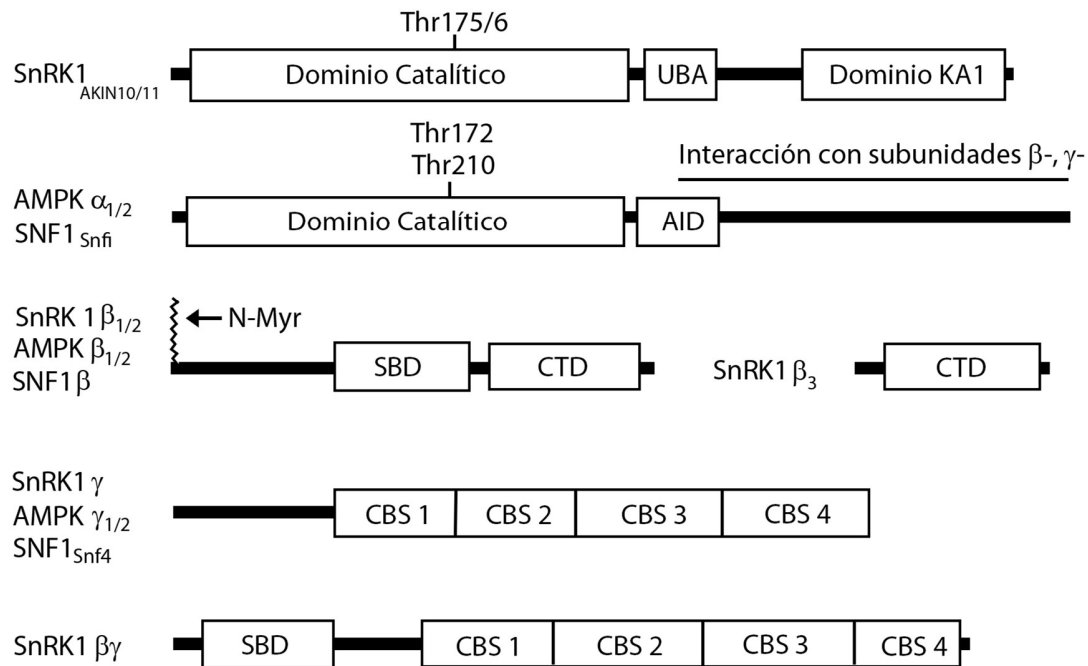


Figura 2. Estructuras de las subunidades de los complejos SNF1/AMPK/SnRK1. Diagramas esquemáticos de las subunidades α , β , y γ de SNF1/AMPK/SnRK1 y sus dominios. El Dominio Catalítico, dominio de unión a proteínas ubiquitinadas (UBA), y el dominio de asociación a cinasa (KA1), así como los residuos de treonina (Thr175/176) fosforilables se muestran para las subunidades α de SnRK1 en plantas (SnRK1.1/SnRK1.2 ó AKIN10/11). Las subunidades α (α 1/2) de AMPK y SNF1 (Snf1) contienen un dominio catalítico con residuos fosforilables Thr172 y Thr210 para mamíferos y levaduras, respectivamente; así como, el dominio de auto inhibición y la región de interacción con las subunidades β , y γ . En la subunidad β se se observa el dominio de unión a glucógeno (GBD) o dominio de unión a almidón (SBD), y el dominio de asociación de la cinasa (CTD). Dos pares de repeticiones cistation- β -sintasa (CBS) se muestran en la subunidad γ . Las plantas también poseen una subunidad β_3 atípica, que carece los dominios SBD; así como una subunidad $\beta\gamma$ que consiste de un dominio SBD fusionado del lado amino a una subunidad γ típica.

2.4 Las vías de señalización son reguladas por eventos de fosforilación y defosforilación de proteínas en los que participan cinasas y fosfatasas.

En organismos de todos los reinos, la fosforilación es un mecanismo altamente conservado. En procariontes existen cinasas que fosforilan residuos de histidina en un sistema regulador de dos componentes para transducir señales ambientales. En cambio, los eucariontes tienen tres tipos de cinasas: las histidina cinasas, las tirosina cinasas y las serina/treonina cinasas. Las tirosina cinasas se encuentran predominantemente en animales, mientras que

las serina/treonina cinasas son más comunes en plantas; sin embargo, las dos clases se manifiestan en ambos reinos. Las plantas han explotado la regulación por fosforilación más notablemente que otros eucariontes; el genoma de *Arabidopsis* codifica para más de mil cinasas, mientras que el del humano sólo 518 (Halford y Hey, 2009).

La fosforilación reversible de proteínas permite una modulación temporal de la función de una proteína; es un mecanismo prevalente en la transducción de señales para regular respuestas celulares a estímulos extracelulares e intracelulares en los tres reinos de la vida. Las proteínas cinasas a menudo funcionan en cascadas en las que cinasas río arriba activan a otras río abajo mediante fosforilación. Al igual que la SNF1 en levaduras y AMPK en mamíferos, la actividad cinasa de SnRK1 es controlada por la fosforilación de una treonina conservada en el asa de activación de su dominio cinasa (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007; Hardie, 2007; Hedbacker y Carlson, 2008; Shen *et al.*, 2009).

Una de las modificaciones post-traduccionales mejor caracterizadas hasta hoy es la fosforilación de proteínas. La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo crucial que controla muchos procesos biológicos en eucariontes. La fosforilación se refiere a la adición reversible de un grupo fosfato de un nucleósido trifosfato a una proteína por acción de una proteína cinasa (Burnett y Kennedy, 1954). Por otro lado, la remoción de este fosfato es catalizada por una proteína fosfatasa (Harris, 1946) (**Error! Reference source not found.**). Como resultado de la fosforilación, una nueva entidad química es originada debido a la carga negativa y el tamaño del grupo fosfato adicionado. Por lo tanto, la fosforilación afecta la estructura de una proteína, su actividad enzimática, y su localización sub-celular (Rall *et al.*, 1956). Algo que es más interesante aún, es que las cinasas y fosfatasas mismas pueden ser fosforiladas y reguladas por otras cinasas y/o fosfatasas (Fischer y Krebs, 1955).

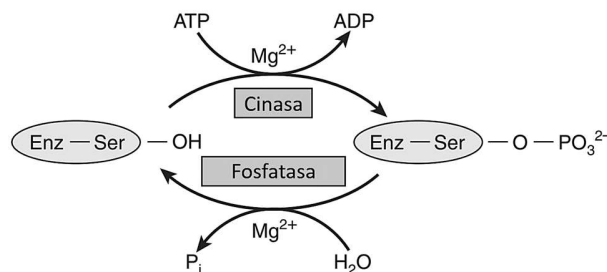


Figura 3. Modificación covalente de una enzima regulada por fosforilación-desfosforilación de un residuo de serina (Ser). La fosforilación de proteínas es una modificación post-traduccionales reversible de las proteínas en la cual el grupo -OH de un residuo de serina, o treonina (Ser en este ejemplo) es modificado

convalentemente por una cinasa mediante la sustitución del fosforilo gamma de ATP.

2.5 Regulación de la actividad de SnRK1

2.5.1 Fosforilación-desfosforilación del complejo SnRK1

Aunque la fosforilación en Thr175 de SnRK1.1 es esencial para la actividad, análisis de extractos totales muestran que no existe diferencia en los niveles de fosforilación sobre ese residuo entre condiciones de estrés y control, lo que sugiere fuertemente la existencia de otros residuos fosforilables, u otros mecanismos que controlan la actividad ante condiciones de estrés (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007; Frago *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013).

Se cuenta con suficiente evidencia para creer que la desfosforilación es un paso crucial en la regulación de la actividad de la SnRK1. En plantas, se describió por primera vez que la fosfatasa PP2C desfosforila a la subunidad α de SnRK1 de espinaca *in vitro* (Sugden *et al.*, 1999). Otro estudio más reciente apoya la misma conclusión al demostrar que las fosfatasas ABI1, PP2C, y PP2CA interaccionan y desfosforilan a la subunidad catalítica de SnRK1 (Rodrigues *et al.*, 2013). Se han descrito otras fosfatasas que interaccionan con SnRK1, pero la relevancia funcional de estas interacciones no se ha sido determinado aún (Fordham-Skelton *et al.*, 2002; Tsugama *et al.*, 2012).

2.5.2 Regulación por metabolitos

Siendo reguladores globales del metabolismo de carbono, es comprensible que las cinasas SNF1/AMPK/SnRK1 sean reguladas por metabolitos. La Snf1 de levaduras responde ante deficiencia de glucosa, el carbohidrato de preferencia, mediante la activación de vías que metabolizan fuentes de carbono alternativas (Celenza y Carlson, 1984). Mientras tanto, ante la presencia de glucosa, Snf1 se encuentra desfosforilada e inactiva (Rubenstein *et al.*, 2006). La AMPK de mamíferos es activada por una alta relación de AMP:ATP, que puede ser provocado por inanición de glucosa, hipoxia, o estrés oxidante. En este caso, el AMP se une a la subunidad γ , que subsecuentemente se une e inactiva a la subunidad α de AMPK (Hedbacker y Carlson, 2008).

Las azúcares son centrales en el metabolismo de las plantas más aún que en el de levaduras y mamíferos. Se ha demostrado que algunas azúcares fosfatadas, tal como la trealosa-6-fosfato (T6P), tienen un papel importante en la regulación de la actividad cinasa

de SnRK1. Se ha observado que la T6P es un inhibidor potente de la SnRK1, actuando en contra de las subunidades catalíticas SnRK1.1 y SnRK1.2 (Zhang, *et al.*, 2009). De manera similar los fosfatos de glucosa, glucosa-1-fosfato y glucosa-6-fosfato (G1P, G6P), también inhiben a la cinasa (Nunes, *et al.* 2013)

2.5.3 Regulación por otras modificaciones post-traduccionales

Se han descrito otras modificaciones post-traduccionales que regulan la actividad de SnRK1. Mientras que en levaduras y mamíferos se ha descrito la acetilación, aún no existe evidencia de que exista esta modificación en subunidades del complejo SnRK1 de *A. thaliana* (Lin *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2014). La ubiquitinación afecta de manera negativa la actividad de SnRK1, lo que sugiere que la actividad y fosforilación estén relacionadas con la estabilidad de los complejos (Ananieva *et al.*, 2008; Baena-Gonzalez *et al.*, 2007). Otra modificación post-traducciona que regula a las subunidades SnRK1 α es la SUMOilación. El complejo SnRK1 es SUMOilado sobre varias subunidades por la SUMO ligasa SIZ1, lo cual conlleva a su degradación mediante el proteasoma (Crozet, *et al.*, 2016). La miristoilación; es decir, la adición de una cadena del ácido graso mirístico cuya función es principalmente dirigir intracelularmente a la proteína modificada, también parece ser una manera de regular al complejo SnRK1 (Oakhill *et al.*, 2010). Por ejemplo, en *A. thaliana* se demostró que los mutantes cuyas subunidades β 1 y β 2 tenían inactivado el dominio N-miristoiltransferasa tendieron a llegar a un arresto en el desarrollo mientras que la actividad cinasa del complejo aumentó cinco veces y se volvieron hipersensibles a la glucosa (Pierre *et al.*, 2007).

2.6 Conservación de las cinasas activadoras

Desde los inicios del estudio de la familia SNF1/AMPK/SnRK1 se demostró que las subunidades catalíticas necesitan ser activadas por la fosforilación sobre su asa de activación (Hawley *et al.*, 2005; Momcilovic *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2000; Sugden *et al.*, 1999). Se han descubierto en estos últimos años, varias cinasas activadoras de la familia SNF1/AMPK/SnRK1. Hoy en día, se han caracterizado dos cinasas de la AMPK en mamíferos (LKB1 y CaMKK β), en levaduras (ELM1, SAK1 y TOS3) y dos en *A. thaliana* (SnAK1/GRIK2 y SnAK2/GRIK1). Es interesante subrayar que las tres cinasas de levadura, las dos cinasas de *A. thaliana* y la CaMKK β de mamíferos están próximas filogenéticamente. De hecho, el descubrimiento de las cinasas activadoras de SnRK1 se

identificaron por similitud de secuencia con las cinasas activadoras de Snf1 de levaduras (Wang *et al.*, 2003).

Los primeros elementos involucrados en esta vía de señalización fueron aportados por estudios de la levadura. Mediante ensayos genéticos se identificaron tres cinasas, ELM1, SAK1 y TOS3, todas capaces de activar los complejos SNF y el triple mutante de levadura *elm1/tos3/pak1* es, tal como la mutante *snf1*, incapaz de usar una fuente alternativa de carbono (Hong *et al.*, 2003; Nath *et al.*, 2003; Sutherland *et al.*, 2003). Se demostró que la complementación de este triple mutante de levadura por cinasas candidatos es una herramienta esencial en la caracterización de las cinasas activadoras en los mamíferos y plantas. Así fue como se demostró que dos cinasas de mamíferos son capaces de activar a la SNF1 en el triple mutante *elm1/tos3/pak1* (Hong y Carlson, 2007). Ambas pueden fosforilar la Thr172 de la AMPK α 1. La primera de éstas, identificada como LKB1, que ya se conocía como proteína supresora de tumores, fue sujeto de estudio de numerosos trabajos (Vaahtomeri y Makela, 2011; Woods *et al.*, 2005). Esta proteína se asocia con otras dos para formar un trímero LKB1/STRAD α /MO25 activo (Boudeau *et al.*, 2004; Zeqiraj *et al.*, 2009). La segunda cinasa, la CaMKK β es sensible al calcio y permite otra vía de activación de la AMPK en respuesta al aumento intracelular de ese catión (Birnbaum, 2005; Hawley *et al.*, 2005; Hurley *et al.*, 2005).

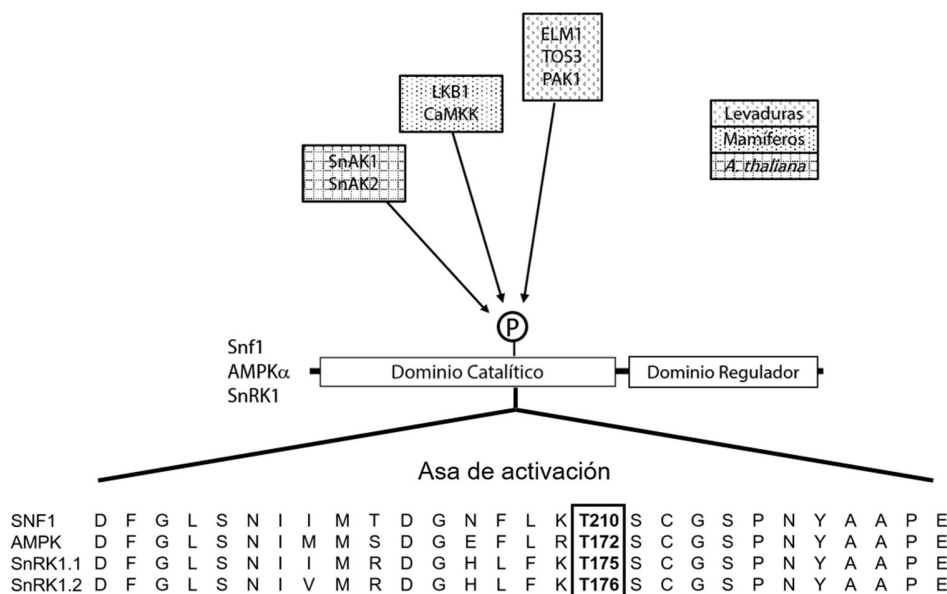


Figura 4. Fosforilación de los dominios catalíticos sobre un residuo conservado en región denominada asa de activación en los eucariontes. En levaduras existen tres cinasas activadoras (ELM1, TOS3, PAK1), dos en mamíferos (LKB1, CaMKK), y dos en *A. thaliana* (SnAK1, SnAK2). Las subunidades catalíticas

de los complejos SNF1/AMPK/SnRK1 de eucariontes contienen dominio catalítico que alberga una región altamente conservada denominada asa de activación sobre la cual existe la fosforilación sobre una treonina en posición 210, 172, y 175/6 en la Snf1, AMPK, y SnRK1.1/2; respectivamente.

En plantas, dos proteínas se identificaron al complementar el mutante *elm1/tos3/pak1* en levadura (Hey *et al.*, 2007). Estas proteínas inicialmente conocidas como GRIK1 y GRIK2 (Geminivirus Rep-Interacting Kinase 1 y 2) también se conocen como SnAK2 y SnAK1 (SnRK Activating Kinase), respectivamente. Estas proteínas activan a la SnRK1 fosforilando la treonina en posición 175 ó 176 (Thr175/6) de las subunidades SnRK1.1 y SnRK1.2, respectivamente (Crozet *et al.*, 2010; Hey *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2009) (**Figura 4**).

2.7 Las cinasas SnAK1 y 2, actores claves en la vía de señalización SnAK/SnRK1

El descubrimiento de las cinasas activadoras en plantas fue el resultado de una comparación de secuencias entre las ya descritas de animales y levaduras. Dos proteínas candidatas, las cinasas GRIK2/SnAK1 y GRIK1/SnAK2 fueron resultado de estos análisis. Estas proteínas inicialmente se identificaron como capaces de interactuar con la proteína Rep de Geminivirus, proteína esencial para la replicación del ADN viral dentro de la célula vegetal hospedera (Elmer *et al.*, 1988; Kong y Hanley-Bowdoin, 2002). Las dos cinasas, cuya denominación SnAK1 y SnAK2 será utilizada en esta tesis, complementan la triple mutante de levadura *elm1 sak1 tos 3* al restaurar la capacidad de este organismo para utilizar una fuente alterna de carbono (Hey *et al.*, 2007).

Se ha establecido una relación estrecha entre las cinasas activadoras en *A. thaliana* y las subunidades catalíticas de los complejos SnRK1 (**Figura 5**). Hasta hoy, se acepta que la fosforilación de la treonina 175 (Thr175) de la SnRK1.1, situada sobre el asa de activación conservada en las proteínas cinasas (Thr176 en el caso de SnRK1.2) provoca la activación de la cinasa (Crozet *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2009). Se ha propuesto un modelo de la regulación de las cinasas SnRK1.1/1.2 por SnAK1/2, tratándose de un mecanismo de fosforilación cruzada (Crozet *et al.*, 2010). Inicialmente, SnAK1 se autofosforila sobre la treonina 153 (154 en el caso de SnAK2), lo que activa a la proteína. En seguida, las dos cinasas se fosforilan una a la otra. Mientras que la cinasa río arriba activa su blanco SnRK1.1/1.2 sobre los residuos Thr175/176 como se establece previamente, esta última es capaz de inhibir de manera en retroalimentación a la SnAK fosforilando el residuo serina en posición 260 (Ser260). Hasta la fecha este mecanismo de fosforilación sólo se ha observado *in vitro*.

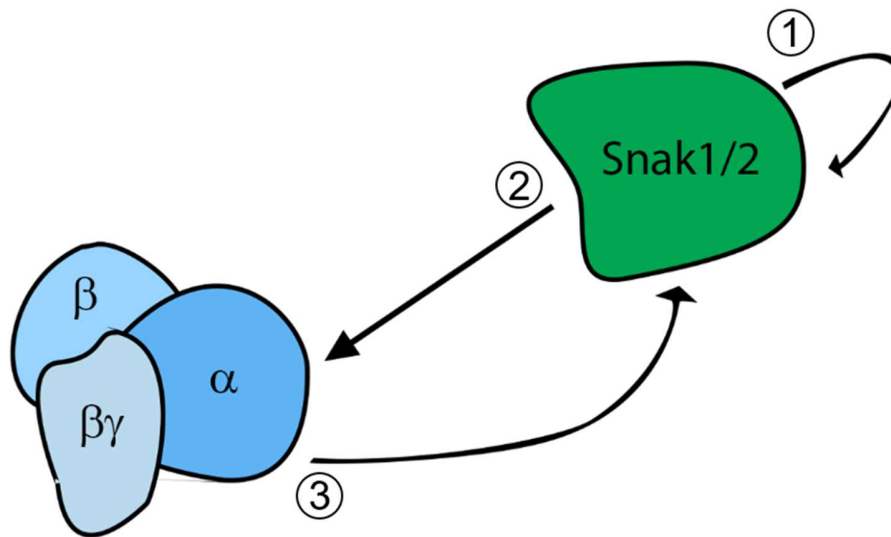


Figura 5. Mecanismo propuesto de interacción por fosforilaciones entre la cinasa SnRK1 y su cinasa activadora SnAK1. Los números representan la secuencia de eventos de fosforilación según (Crozet, *et al.* 2010): la autofosforilación de SnAK1 en Thr153, fosforilación activadora de SnRK1.1 en Thr175 por SnAK1, y la fosforilación inactivadora de SnAK1 en Ser 260 por SnRK1.1.

3 ANTECEDENTES

Se ha descrito que el aumento en la actividad de la SnRK1 en *Arabidopsis thaliana* observada en respuesta a estrés se lleva a cabo sin la modificación significativa del nivel de fosforilación de la Thr175 de la subunidad catalítica SnRK1.1 (Baena-González *et al.*, 2007) (**Figura 6**). Lo anterior sugiere la existencia de un mecanismo alterno de activación al que es actualmente aceptado.

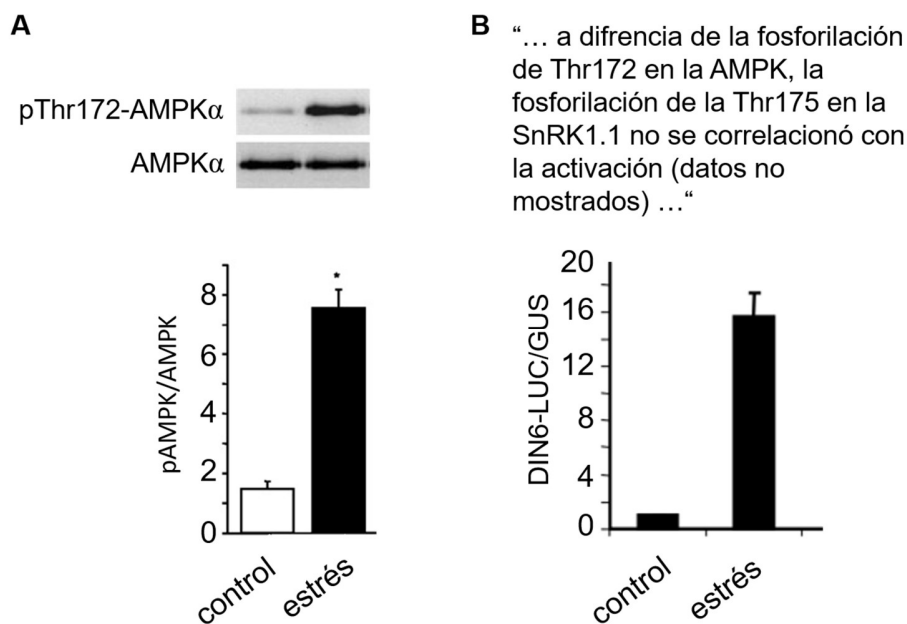


Figura 6. Los niveles de fosforilación de las cinasas AMPK pero no los de la SnRK1 son relacionados a su activación por estrés. A, Western blot anti-pThr172 de la AMPK α en condiciones normales (control) y condiciones de estrés y la cuantificación de las señales (modificado de Soltys, *et al.*, 2006). B, Actividad luciferasa en protoplastos transformados con la construcción DIN6-LUC/ 35S-GUS del gen DIN6, reportero de la actividad de SnRK1.1, en condiciones normales (control) y de estrés (modificado de Baena-Gonzalez, *et al.*, 2007).

De hecho, hasta la fecha falta por comprobar mediante estudios bioquímicos la relación directa que la activación de la cinasa depende únicamente de la fosforilación sobre la Thr175 en SnRK1.1. En parte, esto se debe que para comprobar la fosforilación sobre el asa de activación en la cinasa SnRK1 de *Arabidopsis thaliana* se utiliza un anticuerpo diseñado contra la subunidad catalítica de la AMPK de mamíferos fosforilada sobre el residuo de treonina en posición 172 (α -pThr172 AMPK α 1) que sí bien ya es habitual su uso, sigue siendo una manera indirecta de detección. En efecto, existe homología entre las cinasas y una similitud muy alta en la secuencia de su asa de activación; sin embargo, no

se ha comprobado de otra manera que, durante la activación, el residuo conservado sea el único fosforilado.

Por otro lado, existe un número cada vez creciente de estudios recientes de fosfoproteómica enfocados a descubrir niveles de fosforilación a nivel de proteoma completo en *Arabidopsis thaliana* en respuesta a distintas condiciones de estrés. En la base de datos y predictor de sitios de fosforilación PhosPhAt 4.0, que recopila resultados de estudios fosfoproteómicos y provee una interface que permite visualizar todos estos; se describen varios sitios para SnRK1.1 y SnRK1.2. Es pertinente mencionar que ningún estudio cuyos datos existen en PhosPhAt 4.0 aborda la activación de los complejos SnRK1 (Figura 7).

The screenshot displays the PhosPhAt 4.0 interface for the protein AT3G01090.1. The main panel shows the protein's description and a sequence viewer. The sequence viewer displays the amino acid sequence from position 1 to 50, with predicted phosphorylation sites highlighted in yellow and confirmed sites in bold. The confirmed site is at position 175, which is a threonine (T) residue.

Position	Amino Acid	Status
1	M	
2	D	
3	G	
4	S	
5	G	
6	V	
7	E	
8	S	
9	I	
10	L	
11	P	
12	N	
13	K	
14	L	
15	G	
16	R	
17	T	
18	L	
19	G	
20	I	
21	G	
22	S	
23	F	
24	G	
25	R	
26	V	
27	K	
28	I	
29	A	
30	E	
31	H	
32	A	
33	L	
34	T	
35	G	
36	H	
37	K	
38	V	
39	A	
40	E	
41	H	
42	I	
43	G	
44	H	
45	V	
46	A	
47	I	
48	K	
49	I	
50	L	

Figura 7. Captura de pantalla de PhosPhAt 4.0 para predicción de sitios fosforilables en SnRK1.1. En la interface de la base de datos PhosPhat se despliega la secuencia de la proteína SnRK1.1 y sublineados se encuentran los residuos del péptido identificado con fosforilaciones. En negritas se identifican los residuos fosforilables confirmados experimentalmente y en cuadros resaltados los posibles sitios fosforilables según los algoritmos de esta base de datos. En la proteína SnRK1.1 la treonina (T) en posición 175 es el único residuo fosforilable cuyo papel ha sido explorado por estudios funcionales (captura de pantalla de <http://phosphat.uni-hohenheim.de/> 09 enero 2017).

4 HIPÓTESIS

Para tener actividad cinasa, los dominios catalíticos de SnRK1 deben ser fosforilados por una cinasa activadora (SnAK1/2) sobre el residuo Thr175/176 mientras que una mutación fosfomimética en el sitio de activación de la subunidad catalítica (T175D/T176D) es capaz mantener a la cinasa constitutivamente activa, implicando un solo sitio de fosforilación

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar la activación por fosforilación de los dominios catalíticos determinando si la fosforilación en la posición Thr175 es única y suficiente para activar a los dominios catalíticos de la cinasa SnRK1.

5.2 Objetivos particulares

1. Obtener el cDNA codificante de *SnRK1.1* y *SnRK1.2* mediante PCR.
2. Clonar los productos de PCR en el vector de expresión pGEX-4T-2.
3. Sobre-expresar las proteínas recombinantes en células de *E. coli* DE3 y purificar estas proteínas en una columna de afinidad glutatión-agarosa.
4. Realizar ensayos de fosforilación *in vitro* con ATP marcado.
5. Estudiar la actividad de los dominios catalíticos activados por fosforilación o por mutagénesis fosfomimética midiendo actividad cinasa sobre un péptido blanco.
6. Determinar si existen distintos estados de fosforilación de los dominios catalíticos mediante Phos-tag SDS-PAGE.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

6.1.1 Reactivos generales

CASA COMERCIAL	REACTIVO
BIO-RAD, Hercules, California	<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo de Bradford 5x • Marcador de peso molecular Precision Plus • Solución de acrilamida • IPTG
Promega, Madison, Wisconsin	<ul style="list-style-type: none"> • X-gal
J. T. Baker, Center Valley, PA	<ul style="list-style-type: none"> • Solventes químicos en general (etanol, metanol, isopropanol, acetona, cloroformo, glicina, ácido acético)
Nestlé, Vaud, Switzerland	<ul style="list-style-type: none"> • Leche en polvo libre de grasa Svelty
Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri	<ul style="list-style-type: none"> • Productos químicos (NaCOOH, NaCl, NaOH, MgCl₂, NaH₂PO₄, NaF, EDTA, bromuro de etidio, Triton X-100, Tween-20, PMSF, 2-mercaptoetanol, DTT, ATP, sacarosa, KCl, K₂HPO₄) • Inhibidor de proteasas • Oligonucleotidos • Soluciones de dNTPs • Fenol-cloroformo-isopropanol • TEMED • Kit de purificación de DNA Miniprep • Kit de extracción de gel
Millipore, Billerica, Massachusetts	<ul style="list-style-type: none"> • Filtro de nitrocelulosa 0.45 µm • Membrana para western-blot Immobilon-P • Sustrato de peroxidasa Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate
PerkinElmer, Waltham, Massachusetts	<ul style="list-style-type: none"> • Coctel de centelleo Ultima Gold Cocktail
Kodak, Rochester, New York	<ul style="list-style-type: none"> • Placas fotográficas • Solución de revelado
WakoChemicals, Richmond, VA	<ul style="list-style-type: none"> • Phos-tag
Roche, Basel, Switzerland	<ul style="list-style-type: none"> • Coctél inhibidor de proteasas Complete

6.1.2 Enzimas y amortiguadores

Invitrogen, Carlsbad, California	EcoRI – amortiguador REact 3
	Fosfatasa alcalina de intestino bovino (1U · μ L ⁻¹)– amortiguador REact 3
	DNasa
New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts	BamHI
Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts	T4 DNA ligasa
	Taq DNA polimerasa

6.1.3 Plásmidos vectores y construcciones

6.1.3.1 *Plásmidos vectores*

Promega, Madison, Wisconsin	pGEM-T Easy
GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom	pGEX-4T-2

6.1.3.2 *Construcciones previamente reportadas*

pGEX-4T-2-PHR1	pGEX-4T-2-GRIK1
pET 28-AKIN10	pGEX-4T-2-GRIK2
pET 28 AKIN11	
pET 28-MutAKIN10	
pET 28-MutAKIN11	

6.1.3.3 *Construcciones realizadas en este trabajo*

pGEM-AKIN10 DC
pGEM-AKIN11 DC
pGEM-AKIN10 DC T175D
pGEM-AKIN11 DC T176D
pGEX-4T-2-AKIN10 DC
pGEX-4T-2-AKIN11 DC
pGEX-4T-2-AKIN10 DC T175D
pGEX-4T-2-AKIN11 DC T176D

6.1.4 Cepas bacterianas

E. coli DH5 α
E. coli BL21 (DE3)

6.2 Amplificación de cDNA

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en volúmenes de reacción de 50 μ L utilizando 100 ng de cDNA de la subunidad catalítica de *Arabidopsis thaliana* completa como templado, 200 μ M de cada dNTP, 0.1 μ M de cada primer, 1.25 U de *Taq* polimerasa, 5 μ L de amortiguador 10X, 2mM MgCl₂ y agua para ajustar al volumen final. Un paso de desnaturalización inicial a 95°C se llevó a cabo, seguido por 30 ciclos de 95° C por 30 s, 50° C por 30 s, y 72° C por 1 min, y una extensión final de 5 min a 72° C (Tabla 1). Los productos de PCR se purificaron utilizando un estuche de extracción GenElute Gel Extraction de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Tabla 1. Programa de temperatura y tiempo de PCR

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	No. Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	
Alineamiento	50	30 s	30
Extensión	72	1 min	
Extensión Final	72	5 min	1

Los cebadores utilizados para tanto las mutantes como las no-modificadas fueron los siguientes:

SnRK1.1 FWD	5'- CG GGA TCC ATG GAT GGA TCA GGC -3'
SnRK1.1 REV	5'- CGG GAA TTC TCA ATA ACC ACT AGA GGC -3'
SnRK1.2 FWD	5'- CG GGA TCC ATG GAT CAT TCA TCA -3'
SnRK1.2 REV	5'- CGG GAA TTC TCA ATA GCC ACT TGG AAC -3'

En el caso de las mutantes, un cDNA de SnRK1.1 ó SnRK1.2 con la mutación T175D y T176D se utilizó como templado.

6.3 Electroforesis en gel de agarosa

Para las electroforesis de gel de agarosa se prepararon geles con 1% p/v de agarosa en amortiguador TAE que consiste en 40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA pH 8, adicionados con 0.2 μ g mL⁻¹ EtBr. Antes de cargar las muestras se mezclaron con amortiguador de carga con 25% p/v Ficoll 400, 0.25% p/v azul de bromofenol, y 0.25%

p/v xilencianol. Las muestras se separaron aplicando 80 V hasta que el colorante recorriera una distancia adecuada para separar los fragmentos.

6.4 Construcción de plásmidos

Para clonar los productos de amplificación de SnRK1.1 DC, SnRK1.2 DC, SnRK1.1 DC T175D, SnRK1.2 DC T176D, en un vector de origen, se empleó el estuche de clonación pGEM-T Easy Vector System, llevando a cabo las instrucciones del fabricante, descritas brevemente a continuación. Para cada reacción de ligación se incubaron 150 ng de producto de PCR y 50 ng de plásmido pGEM-T Easy Vector, con 5 μ L de amortiguador Rapid Ligation Buffer 2x, y 1 μ L (3 unidades) de T4 DNA ligasa, llevando a un volumen final de 10 μ L con agua libre de nucleasas, durante 1 h a 25° C (temperatura ambiente). La mezcla de reacción se utilizó para la transformación, de la cual se agregó 5 μ L de la ligación a 50 μ L de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α en hielo. Después de 30 min las células se transfirieron a un baño a 42° C por 45 s, seguido por una incubación de 2 min en hielo y una incubación de 1 h con agitación a 37° C tras agregar 400 μ L de medio líquido LB. Cien μ L de la mezcla se plaquearon sobre medio sólido en cajas Petri con 100 μ g mL⁻¹ ampicilina, 0.5 mM IPTG, 80 μ L·mL⁻¹ X-Gal. Las cajas plaqueadas se incubaron a 37° C toda la noche. Las colonias azules se picaron utilizando palillos de madera esterilizados, se agregaron a 5 mL de medio líquido LB adicionado con 100 μ g mL⁻¹ ampicilina y se dejaron incubando a 37° C con agitación toda la noche. Se extrajo el plásmido utilizando un estuche de extracción de plásmido GenElute Gel Extraction de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La presencia del inserto se confirmó por un ensayo de restricción para el cual fueron empleados 400 ng de plásmido con amortiguador REact 3 10x y agua a un volumen de 15 μ L y se dejó incubar 1 h con 2 unidades de BamHI y 2 h adicionales con 2 unidades de EcoRI, seguido por electroforesis en gel de agarosa para visualizar la liberación del inserto. Para clonar en el vector destino se linearizó el vector pGEX-4T-2 incubando 3 μ g de plásmido con amortiguador de restricción REact 3 10x y 10 unidades de las enzimas de restricción BamHI y EcoRI con suficiente agua para un volumen de reacción de 40 μ L por 3 h a 37° C y se verificó por electroforesis en gel de agarosa. Posterior a la digestión, a la reacción se le adicionó 1 U de fosfatasa alcalina y se dejó incubando 1 h a 37° C. El vector linearizado y el inserto se incubaron en un volumen de 40 μ L empleando 2 y 6 μ L, respectivamente, amortiguador, y 1 U de T4 DNA ligasa. Se transformaron células *E. coli* DH5 α para obtención de plásmido y verificación de la ligación mediante el procedimiento de transformación descrito anteriormente. La integridad de las construcciones se verificó

mediante ensayos de restricción, así como por secuenciación con los oligonucleótidos correspondientes por el laboratorio de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

6.5 Obtención de proteína recombinante

Se produjeron las proteínas recombinantes transformando células quimiocompetentes de *Escherichia coli* BL21:DE3 con el plásmido pGEX-4T2 con el inserto deseado de la misma manera como se describió anteriormente, y se seleccionaron las colonias transformadas en medio sólido con ampicilina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Una colonia transformante de cada construcción se utilizó para inocular el pre-cultivo de 5 mL de medio líquido LB en tubos de ensayo 20x150 mm con la misma concentración de antibiótico y se dejó crecer a 37°C con agitación toda la noche. Se utilizó 1 mL de cada pre-cultivo para inocular 50 mL de medio LB con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina en matraces Erlenmeyer de 250 mL incubando a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0.3$. Para inducir la expresión de la proteína se agregó IPTG a concentración final de 0.1 mM dejando crecer a las células 1 h a 37°C y 4 h adicionales a 25°C con agitación constante. Transcurrido el tiempo de sobreexpresión, se obtuvo el paquete celular centrifugando a $4\ 000 \text{ xg}$ por 20 min. La pastilla celular obtenida se resuspendió en 3 mL de solución de lisis (PBS 1x, 1 mM benzamidida, 1 mM PMSF, benzonasa $0.05 \text{ unidades mL}^{-1}$ de cultivo, 1 mM DTT, 1 % Triton, 1 mg mL^{-1} lisozima, se omitió el EDTA porque interfiere con las aplicaciones posteriores de la proteína recombinante) y se dejaron lisar las células por 30 min a 4°C , se sonicaron las células con 3 ciclos de 15 s de sonicación con 15 s de descanso a una amplitud de 21%. Después de sonicar, la mezcla se centrifugó a $10\ 000 \text{ xg}$ por 20 min a 4°C . El sobrenadante se pasó por un filtro Millipore de $0.45 \mu\text{m}$ y se cargó a una columna de glutatión-agarosa para la purificación de la proteína recombinante fusionada a GST, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se pasó por la columna de $500 \mu\text{L}$ de glutatión-agarosa el sobrenadante filtrado, se recolectó ésta fracción y se lavó la columna con amortiguador de lavado PBS-EW (PBS 1x, 1 mM DTT), finalmente se eluyó en 2-3 fracciones de $500 \mu\text{L}$ con el amortiguador de elución (Amortiguador TNTG: 50 mM Tris pH 8.0, 0.4 M NaCl, 0.1 % Triton x-100, 50 mM Glutatión, 1 mM DTT). La sobreexpresión y purificación se verificó mediante un SDS-PAGE y western blot con anti-SnRK1. Se almacenó la proteína con 50 % glicerol a -70°C hasta su posterior uso.

6.6 Cuantificación de proteína recombinante por el método de Bradford

Las proteínas obtenidas se cuantificaron por el método colorimétrico de Bradford (Bradford 1976). Para esto se añadió a cada pozo en una placa de micro titulación 30 μ L de reactivo de tinción de Bradford 5x, 2 μ L de la elución de la proteína y suficiente agua para completar el volumen a 200 μ L. Se realizó la lectura a una $\lambda = 595$ nm para determinar la concentración de proteína recombinante sobre una curva de calibración de BSA.

6.7 Electroforesis en gel desnaturizante (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida empleados en la electroforesis desnaturizante se prepararon al 12% de acrilamida. Antes de cargar las muestras se mezclaron con amortiguador de muestra 5x (Tris 1 M pH 6.8, glicerol, SDS 1 %, azul de bromofenol 10 %, 1 mM DTT) y se calentaron a 90°C por 5 min. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 120 V durante 1 h 45 min. Para identificar el peso molecular de las proteínas se utilizaron marcadores Precision Plus Protein Dual Color Standards.

6.8 Tinción con Coomassie coloidal

Se preparó la solución de Coomassie con 80% v/v EtOH, 6.4% H₃PO₄, y 3.2% p/v Coomassie Brilliant Blue G-250. Para teñir los geles se dejaron con la solución Coomassie con agitación toda la noche a temperatura ambiente. Para desteñir los geles se enjuagaron con agua destilada con agitación por más de 4 h.

6.9 Detección de proteínas por western blot

Las proteínas se separaron en un SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) Immobilon P, activadas con MeOH y equilibradas con amortiguador de transferencia (25 mM Tris-HCl pH 8.4, 192 mM Glicina, 0.1% SDS); aplicando un voltaje constante de 100 V durante 1 h en una cámara de transferencia húmeda. Una vez concluida la transferencia, la membrana se bloqueó con 20 mL de leche al 5 % en amortiguador PBST (50 mM NaH₂PO₇ pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % Tween) por 1 h con agitación a temperatura ambiente. Después del bloqueo, se agregó suficiente anticuerpo primario para obtener el título deseado (1: 50-60 000) y se dejó incubando a 4°C toda la noche con agitación. Al día siguiente, la membrana se lavó tres veces por 10 min con PBST; posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 h, a

temperatura ambiente, con agitación constante. Una vez transcurrido la incubación, la membrana se lavó tres veces durante 10 min con PBST y se reveló con 700 μ L de sustrato de peroxidasa Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate empleando un fotodocumentador Chemidoc.

6.10 Ensayos de activación de SnRK1

Los ensayos de cinasa se realizaron incubando 5 μ g de los dominios catalíticos de SnRK1 con 0.5 μ g de la SnAK2 en tubos Eppendorf de 1.5 mL a un volumen total de 15 μ L con HEPES 40 mM, $MgCl_2$ 5 mM, ATP 30 mM, inhibidores de fosfatasas (25 mM de β -glicerolfosfato, 10 mM de pirofosfato de sodio, 2 mM de ortovanadato de sodio), inhibidores de proteasas 1x y 2 μ Ci de γ - ^{32}P [ATP] por 1 h a 30° C (**Tabla 2**). La reacción se detuvo al agregar amortiguador de carga y calentando la mezcla por 5 min a 80° C. Se resolvieron las proteínas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana Immobilon-P y se tiñeron con rojo de Ponceau. Después de dejar secar a las membranas se expusieron placas fotográficas o en un sistema de imagen digital Personal X.

Tabla 2. Ensayos de cinasa in vitro

Solución	Concentración final	μL/ reacción
Hepes-NaOH pH 7.5 0.2 M	40 mM	2.5
$MgCl_2$ 125 mM	5mM	0.5
DTT 1M	4 mM	0.06
Inhib de fosfatasas 100 mM	0.5 mM	0.075
Inhibidores de proteasas 100x	1x	1.5
ATP 2.5 mM	30 μ M	0.18
γ - ^{32}P [ATP]	2 μ Ci por reacción	variable

6.11 Ensayos de actividad sobre péptido AMARA

Los ensayos sobre el péptido AMARA (N-AMARAAASAAALARRR-C) se llevaron a cabo en placas de microtitulación con pozos 8 x 12, cada uno a un volumen final de 25 μ L a 30° C. La mezcla de reacción para cada ensayo contenía 40 mM HEPES pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 200 mM ATP, 200 μ M peptido AMARA, 4 mM DTT, 0.5 μ M ácido okadaico, y 1x cocktail inhibidor de proteasas Complete; el ensayo se inicia por la adición de 5 μ L de dominios catalíticos activados. Después de 6 min, una alícuota de 15 μ L de la mezcla de reacción se transfirió a un cuadro de 2 x 2 cm de papel de fosfoceulosa Whatman P81, el filtro se sumergió en 1% v/v ácido fosfórico. Los papeles se lavaron dos veces con 800 mL de ácido fosfórico y

fueron secados enseguida con acetona. La incorporación de P sobre el péptido AMARA se cuantificó por conteo con líquido de centelleo en un contador Beckman Coulter LS 6500 tras sumergir cada papel en coctel de centelleo.

6.12 Determinación de residuos fosforilados por MS

El análisis de las modificaciones post-traduccionales, en este caso buscando la fosforilación, se llevó a cabo en el laboratorio de Proteómica de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Facultad de Química. Se llevaron muestras en solución o en gel de poliacrilamida. En cualquier caso, fue importante llevar mínimo 10 µg de la proteína con la menor cantidad de impurezas posible.

6.13 Phos-tag SDS-PAGE

Geles Phos-tag se prepararon como se indica en el protocolo del fabricante. Brevemente, 50 µM Phos-tag y 50 µM MnCl₂ se agregaron a la solución del gel de separación (350 mM Tris-HCl, pH 8.8, 10% acrilamida, 0.1% SDS, 5 µL TEMED) y se degasificó al vacío antes de agregar persulfato de amonio (SPS) 10% para polimerizar. El gel apilador se preparó sin Phos-tag o MnCl₂ y se degasificó antes de agregar SPS 10%. (Tabla 3). Para cargar el gel, las muestras se calentaron a 80° C por 5 minutos después de agregar 5 µL de amortiguador de carga 3x. La electroforesis se llevó a cabo a 30 mA constantes por gel en amortiguador de corrida. Antes de realizar la transferencia a membrana de PVDF, los geles se incubaron con 1 mM EDTA por 10 min seguido por un lavado en amortiguador de transferencia sin EDTA por 10 min. La transferencia se realizó durante 1 h a 100V.

Tabla 3. Proporciones de reactivos para geles SDS-PAGE

Solución	Volumen para gel de resolución 5 mL	Volumen para gel apilador de 2 mL
Acrilamida 30 % p/v	1.67 mL	0.67 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.25 mL	0.5 mL
SDS 10 % p/v	50 µL	20 µL
Phos-tag	50 µL	20 µL
MnCl ₂ 10 mM	50 µL	20 µL
Agua destilada	1.89 mL	0.756 mL
APS 10 % p/v	25 µL	10 µL
TEMED	5 µL	2 µL

7 RESULTADOS

7.1 Obtención y clonación del cDNA codificante para los dominios catalíticos en el vector de expresión pGEX-4T-2

Los plásmidos del cDNA codificante para las subunidades completas de SnRK1.1 y SnRK1.2 así como las mutantes T175D y T176D fueron resultado de trabajos previos en el laboratorio. Utilizando estos plásmidos como templado y los cebadores específicos para cada subunidad, se realizaron los PCRs. Los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar únicamente los dominios catalíticos SnRK1.1, y SnRK1.2 -que comprende los primeros 341 y 342 residuos de las cinasas completa- respectivamente; así como agregar los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. De tal manera, se logró amplificar secuencias de 1023 y 1026 pb para las subunidades SnRK1.1 y SnRK1.2, respectivamente, que codifican para la región que se conoce como el dominio catalítico; las subunidades α de SnRK1 completas tienen un tamaño de 1623 pb. En la **Figura 8** se presentan los cDNAs de SnRK1.1, SnRK1.1 T175D, SnRK1.2, y SnRK1.2 T176D, purificados y separados por electroforesis en gel de agarosa. Se observa que las

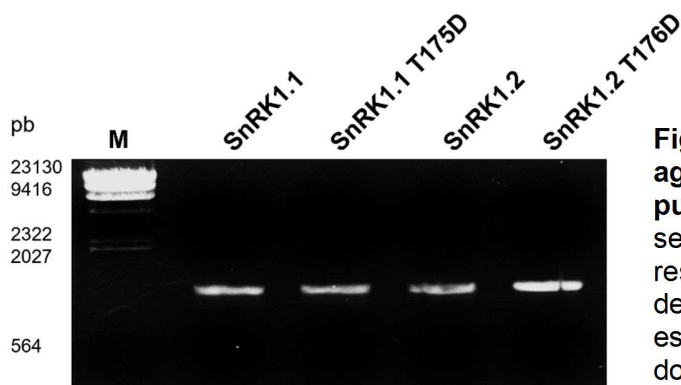


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR purificados. Los productos de la PCR se purificaron porestuchey se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa. Se ubican en el peso esperado, 1023 ó 1026 pb, según el dominio catalítico.

bandas correspondientes para cada dominio catalítico aparecen por debajo de la banda del marcador que indica 2027 pb y superior a la que indica 564 pb, coherente con el peso esperado para las secuencias de los dominios catalíticos.

Subsecuentemente, los cuatro insertos se clonaron el vector pGEM T Easy. Con la ligación se hizo la transformación con células DH5 α y se seleccionaron colonias blancas para extraer plásmido. En la **Figura 9** se distinguen las colonias blancas de las azules, que

fueron seleccionadas para obtención de plásmido. Con el plásmido obtenido, de cada construcción, se realizaron digestiones con las enzimas de restricción EcoRI/BamHI asegurándose que se liberara el inserto de 1023 ó 1026 pb, según el dominio catalítico. La **Figura 10** confirma la obtención de los insertos ya que en cada carril aparece una sola banda entre los marcadores de 2027 y 564 pb correspondiente al inserto codificante para SnRK1.1 de 1023 pb o de SnRK1.3 de 1026pb.

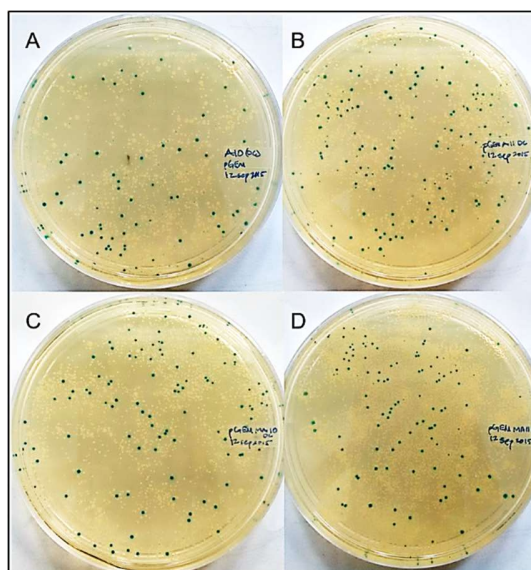


Figura 9 Selección de colonias blancas/azules. Las colonias resultantes de la transformación con las construcciones en el vector pGEM-T Easy A) SnRK1.1 B) SnRK1.1 T175D C) SnRK.1.2 D) SnRK1.2 T176D se seleccionaron en cajas Amp/IPTG/X-Gal, de las cuales las blancas se obtuvo plásmido.

Al mismo tiempo, se linearizó el plásmido pGEX-4T-2 que se utilizó como vector destino, mediante una digestión con las enzimas EcoRI y BamHI. Cabe mencionar que el vector pGEX-4T-2 tiene la característica de permitir la expresión de proteínas fusionadas con Glutación S-Transferasa (GST), la cual permite su purificación por una columna de glutación-agarosa. Como se aprecia en la **Figura 11**, el vector se linearizó tras la digestión ya que aparece una sola banda con el tamaño esperado de 4970 pb. Teniendo tanto los insertos como el vector digerido con BamHI/EcoRI y purificado, se ligaron ambos para obtener las construcciones para las proteínas recombinantes SnRK1-GST. En este punto, se verificaron los plásmidos para asegurar la orientación y la secuencia correcta mediante secuenciación; realizada por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. El alineamiento de las secuencias utilizando el servidor NCBI

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) reveló que las secuencias eran correctas y codificantes para las proteínas deseadas fusionadas con GST.

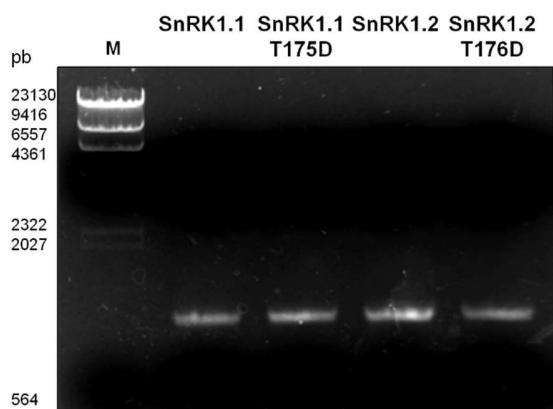


Figura 10. Purificación de insertos para clonar en pGEX. Plásmido purificado a partir de colonias con la construcción en pGEM-T Easy se digirió con enzimas de restricción y se purificó. La electroforesis en gel de agarosa corrobora la purificación de los insertos.

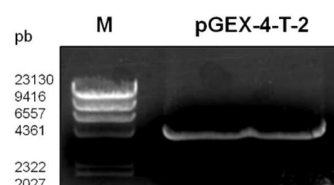


Figura 11. Linearización y purificación del vector pGEX-4-T-2. El vector de expresión se linearizó mediante digestión con enzimas de restricción y se purificó. Se aprecia la única banda en el peso esperado 4047 pb.

7.2 Obtención y purificación de las proteínas recombinantes

Los plásmidos con las construcciones pGEX-SnRK1 así como los plásmidos con las construcciones pGEX-SnAK, las cuáles se habían obtenido previamente en el laboratorio, se utilizaron para transformar células *E. coli* BL21 DE3. Para confirmar la sobre-expresión de las proteínas recombinantes bajo las condiciones empleadas y la purificación de estas, se tomaron distintas fracciones durante la purificación que se resolvieron por SDS-PAGE. En la

Figura 12 se muestran los geles teñidos con azul de Coomassie coloidal tras la separación de los extractos proteicos de las distintas fracciones tomadas durante de la purificación de cada proteína recombinante. Se cargaron fracción insoluble (FI) y fracción soluble (FS) de un control transformado, pero no inducido y la fracción insoluble (FI), fracción soluble (FS), fracción no unida (FNU), fracción de lavado (FL) y finalmente elución (E1) de los extractos proteicos provenientes de cultivos inducidos con 0.1 mM IPTG.

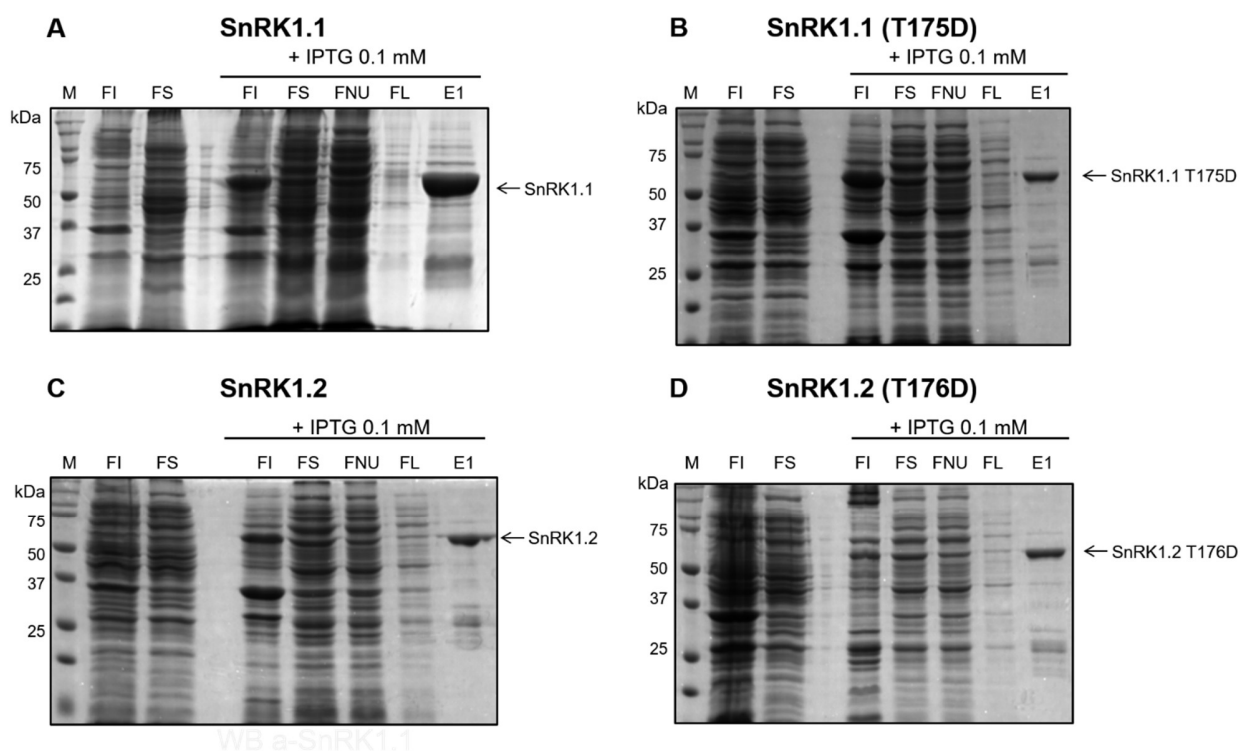


Figura 12 Purificación de las proteínas recombinantes. Las distintas fracciones (FI, Fracción Insoluble; FS, Fracción Soluble; FNU, Fracción No Unida; FL, Fracción de lavado; y E1, Elución 1; con o sin IPTG 0.1M) colectadas durante la purificación de las proteínas recombinantes A) SnRK1.1 B) SnRK1.1 T175D C) SnRK1.2 y D) SnRK1.2 T176D se resolvieron por SDS-PAGE y fueron teñidas con Coomasie. Las flechas señalan la proteína de interés que se ubica al peso esperado (63 kDa) entre las bandas del marcador (M) que indican lo pesos moleculares de 75 y 50 kDa.

En la **Figura 13** se muestran los geles teñidos con azul de Coomasie para las sobre-expresiones y purificaciones de las cinasas activadoras SnAK1 y SnAK2 recombinantes. Para corroborar la purificación de las proteínas deseadas, en el caso de los dominios catalíticos, se realizó un western blot con anticuerpos dirigidos contra las subunidades catalíticas de SnRK1. Como se aprecia en la **Figura 14**, los anticuerpos reconocieron una sola banda entre los marcadores de 75 kDa y 50 kDa que corresponde al peso esperado (62 kDa) para las proteínas recombinantes fusionadas con GST.

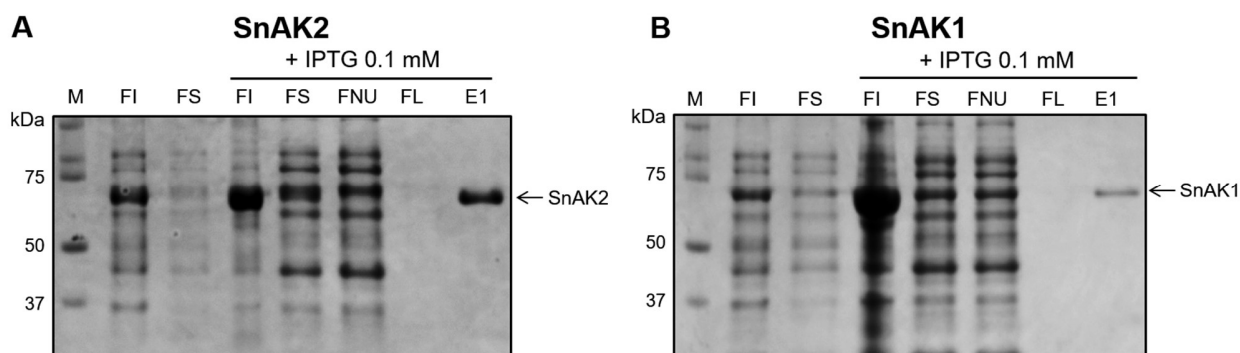


Figura 13 Purificación de las proteínas recombinantes. Las distintas fracciones (FI, Fracción Insoluble; FS, Fracción Soluble; FNU, Fracción No Unida; FL, Fracción de lavado; y E1, Elución 1; con o sin IPTG 0.1M) colectadas durante la purificación de las proteínas recombinantes A) SnAK2 B) SnAK2 se resolvieron por SDS-PAGE y fueron teñidas con Coomassie. Las flechas señalan la proteína de interés que se ubica al peso esperado (71 kDa) entre las bandas del marcador (M) que indican los pesos moleculares de 75 y 50 kDa.

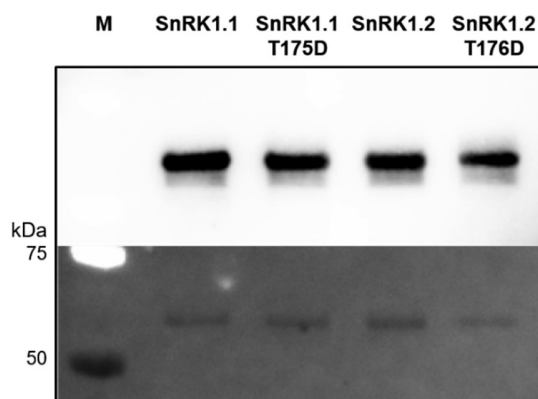


Figura 14 Corroboración de las proteínas purificadas mediante western blot. Las proteínas recombinantes se reconocen por el anticuerpo (anti-SnRK1) dirigido contra las subunidades catalíticas en el western blot (arriba). Se muestra la membrana utilizada para el western como control de carga (abajo) teñida con rojo de Ponceau.

7.3 Ensayos de activación de SnRK1

Teniendo a los dominios catalíticos de SnRK1 que se probarían como sustratos de las cinasas SnAK2, con el fin de que estas últimas logran activar a las primeras; se realizaron ensayos de fosforilación. Sirvieron como controles en estas reacciones las incubaciones de los dominios catalíticos solos, así como las cinasas activadoras solas, anticipando ver únicamente la incorporación de marca radiactiva debido a la autofosforilación. Por lo tanto,

se pudo distinguir entre actividad de autofosforilación y fosforilación por SnAK2. Las reacciones se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas. La misma membrana que se expuso con la placa fotográfica se tiñó con Rojo de Ponceau para tener una indicación del control de carga. En la **Figura 15** se presentan las autorradiografías con sus respectivos controles. Las autorradiografías revelan una banda a 72 kDa correspondiente a la autofosforilación de SnAK2 en todas las reacciones en las que incluyó ésta proteína. Importantemente, en las reacciones en las que se utilizó SnAK2, menos en la que se incubó sola, aparece una banda adicional de aproximadamente 63 kD. El PM de estas bandas corresponde a los tamaños de las SnRK1.1 detectados en western blot. Al comparar la autorradiografía con el control de carga, se establece que la banda superior corresponde a la SnAK2 y la banda inferior corresponde al dominio catalítico utilizado en cada reacción. En ninguna reacción en la que se incubó el dominio catalítico solo, exceptuando a la preparación con SnRK1.2, hubo una ligera incorporación de marca. Sorprendentemente, aparece una señal de incorporación de marca radiactiva proveniente de la fosforilación de ambas mutantes, SnRK1.1 T175D, y SnRK1.2 T176D, cuya mutación precisamente inhabilitaría la fosforilación de los dominios catalíticos ya que, hasta el momento, la posición mutada alberga al único sitio fosforilable por la cinasa activadora SnAK.

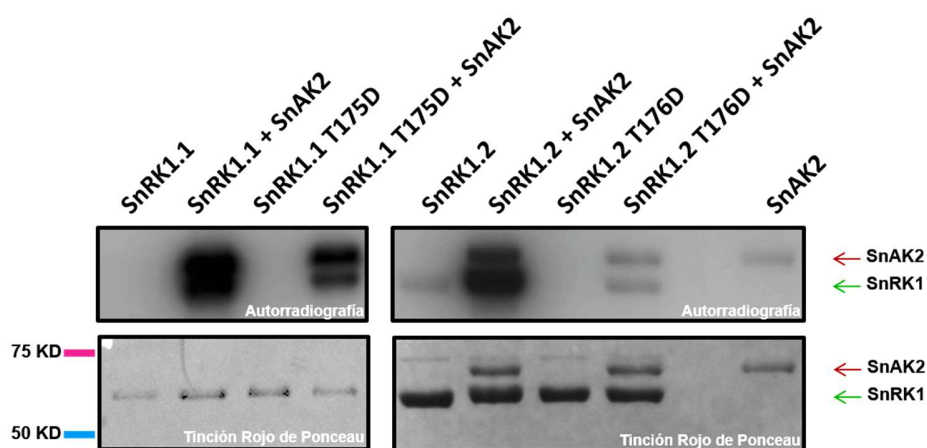


Figura 15 Fosforilación in vitro de dominios catalíticos SnRK1 por la cinasa activadora SnAK2. La SnRK1.1 al ser incubada sola no incorpora marca, no se autofosforila de manera notable. Cuando se incubaba con SnAK2 aparecen dos bandas correspondientes a la autofosforilación de SnAK2 y la fosforilación de SnRK1.1. De manera similar, SnAK2 logra incorporar marca sobre el mutante SnRK1.1 T175D. En comparación, la SnRK1.2 incubada sola sí logra incorporar marca; se logra autofosforilar. De igual manera, SnAK2 incorpora fosfato marcado sobre el mutante SnRK1.2 T176D.

7.4 Ensayos de actividad sobre el péptido AMARA

Inmediatamente después de realizar la fosforilación *in vitro* de los dominios catalíticos de SnRK1 mediante ensayos de activación, se realizó el ensayo de actividad sobre el péptido AMARA. Las actividades específicas de cada preparación se calcularon como nanomol de PO₄ incorporado por minuto sobre el péptido AMARA por cada miligramo de proteína (nmol·min⁻¹·mg⁻¹). Los resultados mostrados en la **Figura 16** representan los promedios de 4 experimentos independientes con el error estándar. Como es posible apreciar la SnRK1.1 muestra muy poca actividad al ser incubada sola, pero al ser incubada en conjunto con SnAK2, su actividad incrementa más de cien veces; la mutante fosfomimética SnRK1.1 T175D sola no parece tener actividad apreciable y ésta aumenta muy poco al ser incubada con SnAK2; sorprendentemente, SnRK1.2 sola muestra actividad considerable, aunque menor a la de SnRK1.1 incubada con SnAK2, se nota un leve pero estadísticamente significativo aumento en la actividad de SnRK1.2 incubada con SnAK2 con respecto a la – SnRK1.2. Es interesante observar que la mutante SnRK1.2 T176D presentó tener actividad cinasa sobre AMARA, aunque relativamente baja; la SnRK1.2 T176D al ser incubada con SnAK2, en cambio, no demostró un aumento en actividad significativa; para estos experimentos se utilizó como control negativo SnAK2 sola.

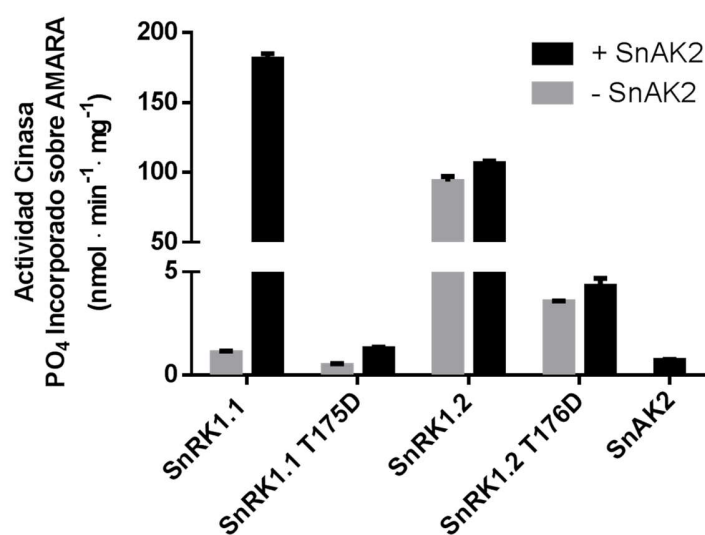


Figura 16. Actividad cinasa de los dominios catalíticos. Se incubaron los dominios catalíticos SnRK1.1, SnRK1.1 T175D, SnRK1.2, SnRK1.2 T176D (2µg de proteína recombinante) con la cinasa activadora SnAK2 (1µg de proteína recombinante) en ensayo que contenía 2 µCi de [γ-32P]ATP, 30 µM ATP, y 90 µM AMARA, a 30 °C por 30 min. La radioactividad incorporada al péptido AMARA se contó. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes con dos repeticiones de la misma muestra.

7.5 Determinación de residuos fosforilados por espectrometría de masas

Para determinar las posiciones de los sitios de fosforilación en SnRK1.1, las proteínas se fosforilaron con ATP no-marcado radiactivamente. Los péptidos resultantes fueron digeridos con tripsina y analizados por espectrometría de masas por la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria de la Facultad de Química (USAI, UNAM) para el estudio de modificaciones post-traduccionales de los dominios catalíticos.

Los resultados del análisis revelaron un fragmento de la subunidad SnRK1.1 fosforilado, **RTLIGSFGRVKIAEHALTGHKV**. Notablemente, otro “subfragmento” con secuencia **RTLIGSFGRV** no se fosforiló (**Figura 17**). Tras esta evidencia se puede deducir que al menos una fosforilación sobre la subunidad SnRK1.1 ocurre sobre la treonina indicada en la **Figura 17**.

7.6 Determinación de grados de fosforilación mediante Phos-tag SDS-PAGE

Se analizó el grado de fosforilación de los dominios catalíticos por las cinasas activadoras mediante un WB después de la separación de las incubaciones *in vitro*, anticipando ver distintas bandas si existieran varios grados. En la **Figura 18**, se presentan las bandas producidas al incubar con el anticuerpo anti-SnRK1. En el caso de la SnRK1.1, se observan dos bandas fuertes en el carril correspondiente al dominio catalítico fosforilado por SnAK2 con respecto al que se cargó la SnRK1.1 sola. Se pueden observar dos ligeras bandas en mutante SnRK1.1 T175D incubada con SnAK2, lo que explicaría la incorporación de marca radiactiva encontrada anteriormente, indicando un sitio alternativo de fosforilación. SnRK1.2 sola, en cambio, muestra una banda producto de una reacción de autofosforilación.

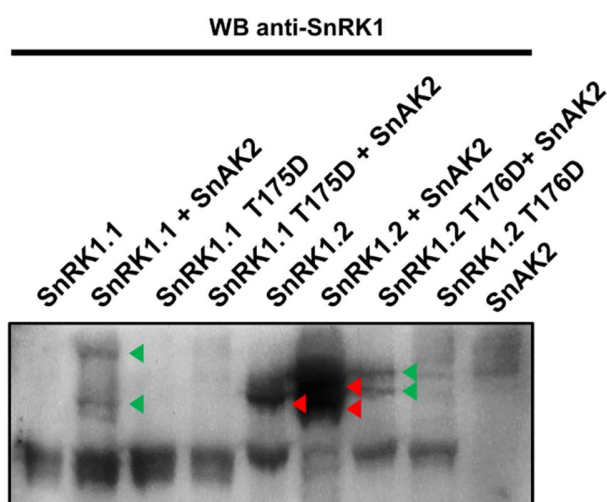


Figura 18 Grados de fosforilación de los dominios catalíticos. Western blot revelado contra SnRK1.1 muestra todos los fragmentos separados sin importar la fosforilación del motivo del asa de activación. Las flechas rojas representan los péptidos que tienen fosforilación por lo menos sobre el residuo T175, las flechas verdes aquellos que muestran fosforilación pero en algún otro sitio.

Interesantemente, al activar el dominio catalítico con la cinasa activadora, toda la proteína modifica su migración, indicando que toda está siendo fosforilada. Un dato a resaltar es que la acción de la cinasa SnAK2 sobre SnRK1.2 se observa en sitios alternativos a la treonina del asa de fosforilación, dado que aparecen dos bandas muy claras, que no son producto de una reacción de autofosforilación. En el caso de la SnAK2 sola, el anticuerpo parecería reconocer una banda de manera inespecífica, ya que no comparten ningún epítipo.

8 DISCUSIÓN

Desde que se descubrió la actividad cinasa de la familia SNF1/AMPK/SnRK1, se postuló que su activación es regulada mediante fosforilación por una cinasa río arriba. Sin embargo, los estudios realizados no han logrado precisar detalladamente la regulación por fosforilación de SnRK1. Aunque queda claro que la fosforilación del residuo T175/176 (en ambas subunidades catalíticas) es necesaria para la actividad, se ha observado que en *Arabidopsis thaliana* no existen diferencias en los niveles de fosforilación de estas proteínas cuando se evalúan de plantas que provienen de condiciones de estrés en comparación con las de control, sugiriendo que existen otros residuos fosforilados o que otros mecanismos están involucrados en la regulación de la actividad ante estrés (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007; Fragoso *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2013). La función de las SnAKs como cinasas río arriba de SnRK1 permanece por determinarse en un modelo *in vivo*. Un modelo actual sobre la señalización cruzada entre la cinasa SnRK1 y su cinasa activadora SnAK sugiere que existe la autofosforilación activadora de SnAK, que a su vez fosforila a SnRK1 sobre el residuo Thr175 para conferirle actividad de cinasa (Crozet *et al.*, 2010). Cabe mencionar que en tal estudio se demuestra la fosforilación cruzada *in vitro* únicamente entre los isómeros SnRK1.1 y SnAK2, de la cinasa y cinasa activadora, respectivamente; ya que siempre se han considerado redundantes a los isómeros tanto de las cinasas SnRK1: SnRK1/SnRK1.2; como aquellos de las cinasas activadoras SnAK: SnAK2/SnAK1.

En este trabajo, se establecieron las condiciones *in vitro* adecuadas para lograr la activación de los dominios catalíticos de SnRK1. Se realizaron ensayos de activación de SnRK1, mediante los cuales se determinó que la actividad de autofosforilación difiere. La actividad de autofosforilación, determinada como la actividad observada al incubar a la subunidad sin cinasa activadora, fue mucho mayor para la SnRK1.2; hallazgo determinado consistentemente en los ensayos de activación de SnRK1, actividad sobre péptido AMARA, y Phos-tag. Al mismo tiempo, los ensayos en SDS-Phos-tag y MS proveen evidencia sobre al menos un residuo fosforilado además de la Thr175 o Thr176.

Mediante los ensayos de activación de los dominios catalíticos mutantes, se puso en evidencia la fosforilación en un sitio distinto al residuo Thr175/176 ya que se observa la incorporación de marca radiactiva sobre éstos péptidos. El residuo mutado (T175D/T176D) no es fosforilable, por lo que la marca incorporada indica que un residuo (o residuos) distinto a la Thr175/176 fue fosforilado. En efecto, la primera pista de que las cinasas pueden ser

fosforiladas en un sitio distinto al conocido, la treonina en el asa de activación, se obtuvo al revelar la fosforilación con marca radiactiva los ensayos de activación de SnRK1. Sorprendentemente existe la incorporación de fosfato marcado en los mutantes. La mutación de aspártico, un residuo sin grupos hidroxilo (-OH) fosforilables, valida la hipótesis de que existe un sitio en una posición distinta.

Por otro lado, para determinar si la fosforilación sobre la treonina 175 de SnRK1 es suficiente para conferirle actividad a la cinasa, se evaluó la actividad de los mutantes SnRK1.1 T175D y SnRK1.2 T176D los cuales –dado el tamaño y carga negativa del aspartato- se pretendió que mimetizaran a los péptidos constitutivamente fosforilados sobre ese residuo. Interesantemente, los ensayos de actividad sobre el péptido blanco AMARA revelaron que las proteínas fosfomiméticas tienen muy poca actividad cinasa sobre dicho péptido blanco y que SnAK2 no les confiere mayor actividad a pesar de que sí las logre fosforilar en un sitio alterno. Dicha observación resalta la necesidad de caracterizar detalladamente el papel funcional en la actividad cinasa de la(s) fosforilación(es) adicionales.

La activación *in vitro* del dominio catalítico de SnRK1.1 por SnAK2 es incuestionable ya que la actividad cinasa sobre el péptido AMARA aumentó más de 100 veces. Aunque la actividad de SnRK1.2 evidentemente no es tan alta sobre el péptido AMARA como la de SnRK1.1, el ensayo con Phos-tag revela que SnRK1.2 incorpora una mayor cantidad de fosfato sobre otros aminoácidos. Experimentos adicionales confirmarían si se trata de una especificidad diferente entre las dos isoformas de la subunidad catalítica.

Evidentemente, por la separación de distintas bandas observada en los ensayos Phos-tag, existen distintas poblaciones que se pueden agrupar por la cantidad de fosfatos incorporados de una misma reacción, confirmando de otra manera la fosforilación alterna a un solo residuo. A pesar de que la actividad de SnRK1.2 es menor que la de SnRK1.1, es evidente por los ensayos de Phos-tag que SnRK1.2 incorpora más fosfato. Se podría pensar de estos datos que existe una especificidad por sustrato distinta, es decir que SnRK1.1 y SnRK1.2 tengan distinta afinidad por diversos sustratos. En este ejemplo SnRK1.1 tiene mayor afinidad por AMARA pero posiblemente también sea un efecto observable probando con sustratos fisiológicamente relevantes. Los resultados también sugieren una afinidad distinta entre SnAK2 y las dos distintas subunidades de SnRK1, ya que la actividad de SnRK1.2 no aumentó tanto en comparación con la actividad conferida solamente a causa de su autofosforilación.

Para indagar sobre la posición concreta del residuo en cuestión se estudió a la cinasa SnRK1.1 fosforilada mediante espectrometría de masas. Los resultados del análisis, anteriormente descritos, identificaron al fragmento **RTLIGSFGRVKIAEHALTGHKV** fosforilado mientras que un fragmento con secuencia **RTLIGSFGRV** no se fosforiló a pesar de tratarse de la misma muestra; lo que podría ser una indicación de que la posición del residuo fosforilado es la treonina del fragmento KIAEHALTGHKV. En estudios recientes de fosfoproteómica, enfocados a descubrir niveles de fosforilación a nivel transcriptómico, se han identificado varios sitios de fosforilación en SnRK1.1 y SnRK1.2 debido a distintas condiciones de estrés. En la base de datos de sitios de fosforilación PhosPhAt 4.0 se han descrito residuos fosforilados en SnRK1.1 y SnRK1.2 y se predicen otros sitios entre los que se encuentra el identificado en el presente trabajo.

Algo importante que considerar, es que al trabajar con el Dominio Catalítico de las proteínas de SnRK1 se excluyó la influencia de la región homóloga al dominio de auto inhibición en los SNF1/AMPK. A diferencia de sus ortólogos en levadura y mamíferos, no existen trabajos sobre el papel de tal dominio sobre la actividad cinasa en la SnRK1 de plantas, más que la mención sobre su similitud en secuencia. Lo anterior sugiere que trabajar con mutantes es valioso: se demostró en este trabajo que los dominios catalíticos son suficientes para lograr una cinasa funcional que reconoce a sus blancos. Trabajar con los dominios catalíticos produjo otra ventaja ya que el sitio que estamos tratando de identificar necesariamente se encuentra entre los primeros 380 residuos. Interesantemente, estos resultados no se informaron cuando se realizaron los ensayos con la subunidad completa (Crozet *et al.*, 2010).

La fosforilación tiene un papel importante en la función de una proteína. Los resultados de esta tesis indican que SnRK1 es fosforilada *in vitro* en uno o más sitios distintos a T175 y que la fosforilación se encuentra cerca de la región amino terminal. No se sabe aún si ésta fosforilación es funcional o el papel que desempeñe. Se requerirá la mutación de los posibles sitios para lograr comprender completamente el papel de la fosforilación en la regulación de las cinasas SnRK 1.1 y 1.2.

Hasta ahora, la identificación de cinasas activadoras han conducido solamente al estudio de SnAK1 y SnAK2 y su función en la activación *in vitro* de SnRK1.1 y SnRK1.2. En planta, solamente se ha concluido que la acumulación de las cinasas activadoras se traslapa con las subunidades catalíticas en las regiones meristemáticas de hojas jóvenes, por lo que la presencia de otro tipo de cinasas que activen a la SnRK1 se sugiere fuertemente, ya que la

actividad de SnRK1 se encuentra presente en otros tejidos y diversos estadios de desarrollo (Shen *et al.*, 2009). Esto concuerda con lo que ocurre en mamíferos y levaduras en donde se han identificado más de un tipo de cinasas activadoras para la regulación de las subunidades catalíticas (Shen *et al.*, 2009).

9 CONCLUSIONES

SnAK2 fosforila y activa a los dominios catalíticos de SnRK1

Se demostró mediante varias técnicas bioquímicas que los dominios catalíticos de las subunidades SnRK1.1 y SnRK1.2 son capaces de ser fosforilados por SnAK2 lo cual los activa y les confiere actividad cinasa.

El sitio de activación en posición Thr175/176 de SnRK1 no es el único sitio fosforilable por SnAK2 *in vitro*

El ensayo Phos-tag SDS-PAGE que permite separar una proteína dependiendo del número de fosfatos incorporados sobre sus residuos, reveló que existe más de un grado de fosforilación de los dominios catalíticos. Sobre todo la fosforilación de los mutantes confirma que la fosforilación existe en otro sitio.

Las mutaciones T175D y T176D en el sitio de activación de los dominios catalíticos de SnRK1.1 y SnRK1.2, respectivamente, le confieren actividad constitutiva; aunque la actividad cinasa es muy baja.

Los dominios catalíticos mutantes tienen actividad cinasa, aunque esta es relativamente baja en comparación con los dominios catalíticos no mutantes activados por SnAK2.

10 PERSPECTIVAS

Identificar los posibles sitios de fosforilación mediante un análisis por espectrometría de masas.

Los avances en la instrumentación de MS y las novedosas técnicas de enriquecimiento de fosfopéptidos son recursos que se podrían explotar para lograr un primer acercamiento a la determinación de los sitios de fosforilación de las proteínas estudiadas.

Estudios funcionales *in vitro* de los distintos residuos fosforilables determinados por MS en el mecanismo de activación de la cinasa

Sería necesario corroborar los sitios de fosforilación determinados por MS mediante mutagénesis dirigida para determinar su papel en la activación o modificación de actividad cinasa de la subunidad catalítica.

Evaluar la importancia biológica de los sitios de fosforilación de SnRK1.1 y SnRK1.2 mediante estudios *in vivo*

Aunque prácticamente todo lo que se conoce a la fecha del mecanismo de activación de la subunidades catalíticas SnRK1.1 y SnRK1.2 se deriva de estudios *in vitro*, sería de suma importancia probar los efectos de las mutantes y comprobar los modelos establecidos sobre la cascada de señalización *in vivo*. Hasta la fecha, no se ha comprobado el papel de las cinasas activadoras *in vivo*.

Estudiar las diferencias entre la fosforilación de SnRK1.1 y SnRK1.2 y su posible fosforilación cruzada

Partiendo de algunos resultados de este trabajo como antecedente directo, se podría esclarecer la diferencia entre los sitios de fosforilación. Se podría investigar si es un mecanismo de regulación en sí estudiando si existe fosforilación cruzada entre ambas y en qué sitios.

11 REFERENCIAS

- Adams, J., Chen, Z.-P., Van Denderen, B.J.W., Morton, C.J., Parker, M.W., Witters, L.A., Stapleton, D., y Kemp, B.E. (2004). Intrasteric control of AMPK via the $\gamma(1)$ subunit AMP allosteric regulatory site. *Protein Science : A Publication of the Protein Society* **13**, 155-165.
- Alderson, A., Sabelli, P.A., Dickinson, J.R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Shewry, P.R., y 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**, 8602-8605.
- Amodeo, G.A., Rudolph, M.J., y Tong, L. (2007). Crystal structure of the heterotrimer core of *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homologue SNF1. *Nature* **449**, 492-495.
- Ananieva, E.A., Gillaspay, G.E., Ely, A., Burnette, R.N., y Erickson, F.L. (2008). Interaction of the WD40 domain of a myoinositol polyphosphate 5-phosphatase with SnRK1 links inositol, sugar, y stress signaling. *Plant physiology* **148**, 1868-1882.
- Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., y Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress y energy signalling. *Nature* **448**, 938-942.
- Baena-Gonzalez, E., y Sheen, J. (2008). Convergent energy y stress signaling. *Trends in plant science* **13**, 474-482.
- Bertolaet, B.L., Clarke, D.J., Wolff, M., Watson, M.H., Henze, M., Divita, G., y Reed, S.I. (2001). UBA domains mediate protein-protein interactions between two DNA damage-inducible proteins. *Journal of molecular biology* **313**, 955-963.
- Birnbaum, M.J. (2005). Activating AMP-activated protein kinase without AMP. *Molecular cell* **19**, 289-290.
- Bitrian, M., Roodbarkelari, F., Horvath, M., y Koncz, C. (2011). BAC-recombineering for studying plant gene regulation: developmental control y cellular localization of SnRK1 kinase subunits. *The Plant journal : for cell y molecular biology* **65**, 829-842.
- Boudeau, J., Scott, J.W., Resta, N., Deak, M., Kieloch, A., Komander, D., Hardie, D.G., Prescott, A.R., van Aalten, D.M., y Alessi, D.R. (2004). Analysis of the LKB1-STRAD-MO25 complex. *Journal of cell science* **117**, 6365-6375.
- Bouly, J.-P., Gissot, L., Lessard, P., Kreis, M., y Thomas, M. (1999). *Arabidopsis thaliana* proteins related to the yeast SIP y SNF4 interact with AKIN α 1, an SNF1-like protein kinase. *The Plant Journal* **18**, 541-550.
- Buchberger, A. (2002). From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary. *Trends in cell biology* **12**, 216-221.
- Burnett, G., y Kennedy, E.P. (1954). The enzymatic phosphorylation of proteins. *The Journal of biological chemistry* **211**, 969-980.
- Carlson, M., Osmond, B.C., y Botstein, D. (1981). Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* **98**, 25-40.
- Celenza, J.L., y Carlson, M. (1984). Cloning y genetic mapping of SNF1, a gene required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular y cellular biology* **4**, 49-53.
- Coello, P., Hirano, E., Hey, S.J., Muttucumar, N., Martinez-Barajas, E., Parry, M.A., y Halford, N.G. (2012). Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related

- protein kinase (SnRK) 1 in wheat y activation of a putative calcium-dependent SnRK2. *Journal of experimental botany* **63**, 913-924.
- Crozet, P., Jammes, F., Valot, B., Ambard-Bretteville, F., Nessler, S., Hodges, M., Vidal, J., y Thomas, M. (2010). Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) y its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *The Journal of biological chemistry* **285**, 12071-12077.
- Chen, L., Jiao, Z.H., Zheng, L.S., Zhang, Y.Y., Xie, S.T., Wang, Z.X., y Wu, J.W. (2009). Structural insight into the autoinhibition mechanism of AMP-activated protein kinase. *Nature* **459**, 1146-1149.
- da Silva Xavier, G., Leclerc, I., Varadi, A., Tsuboi, T., Moule, S.K., y Rutter, G.A. (2003). Role for AMP-activated protein kinase in glucose-stimulated insulin secretion y preproinsulin gene expression. *The Biochemical journal* **371**, 761-774.
- Elmer, J.S., Brand, L., Sunter, G., Gardiner, W.E., Bisaro, D.M., y Rogers, S.G. (1988). Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus. II. The product of the AL1 coding sequence is required for replication. *Nucleic acids research* **16**, 7043-7060.
- Emanuelle, S., Doblin, M.S., Stapleton, D.I., Bacic, A., y Gooley, P.R. (2015). Molecular Insights into the Enigmatic Metabolic Regulator, SnRK1. *Trends in plant science*.
- Farras, R., Ferrando, A., Jasik, J., Kleinow, T., Okresz, L., Tiburcio, A., Salchert, K., del Pozo, C., Schell, J., y Koncz, C. (2001). SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *The EMBO journal* **20**, 2742-2756.
- Fordham-Skelton, A.P., Chilly, P., Lumbreras, V., Reignoux, S., Fenton, T.R., Dahm, C.C., Pages, M., y Gatehouse, J.A. (2002). A novel higher plant protein tyrosine phosphatase interacts with SNF1-related protein kinases via a KIS (kinase interaction sequence) domain. *The Plant journal : for cell y molecular biology* **29**, 705-715.
- Fragoso, S., Espindola, L., Paez-Valencia, J., Gamboa, A., Camacho, Y., Martinez-Barajas, E., y Coello, P. (2009). SnRK1 isoforms AKIN10 y AKIN11 are differentially regulated in *Arabidopsis* plants under phosphate starvation. *Plant physiology* **149**, 1906-1916.
- Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Umezawa, T., Fujita, M., Maruyama, K., Ishiyama, K., *et al.* (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology* **50**, 2123-2132.
- Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology y molecular biology reviews* : MMBR **62**, 334-361.
- Ghillebert, R., Swinnen, E., Wen, J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., Rolland, F., y Winderickx, J. (2011). The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge y energy regulator: structure, function y regulation. *FEBS Journal* **278**, 3978-3990.
- Gissot, L., Polge, C., Bouly, J.P., Lemaitre, T., Kreis, M., y Thomas, M. (2004). AKINbeta3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast y mammals non-catalytic beta-subunits. *Plant molecular biology* **56**, 747-759.
- Guo, Y., Xiong, L., Song, C.P., Gong, D., Halfter, U., y Zhu, J.K. (2002). A calcium sensor y its interacting protein kinase are global regulators of abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Developmental cell* **3**, 233-244.
- Halford, N.G., y Hardie, D.G. (1998). SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant molecular biology* **37**, 735-748.

- Halford, N.G., Hey, S., Jhurreea, D., Laurie, S., McKibbin, R.S., Paul, M., y Zhang, Y. (2003). Metabolic signalling y carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *Journal of experimental botany* **54**, 467-475.
- Halford, N.G., Hey, S., Jhurreea, D., Laurie, S., McKibbin, R.S., Zhang, Y., y Paul, M.J. (2004). Highly conserved protein kinases involved in the regulation of carbon y amino acid metabolism. *Journal of experimental botany* **55**, 35-42.
- Halford, N.G., y Hey, S.J. (2009). Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic y stress signalling in plants. *The Biochemical journal* **419**, 247-259.
- Hanson, J., Hanssen, M., Wiese, A., Hendriks, M.M., y Smeekens, S. (2008). The sucrose regulated transcription factor bZIP11 affects amino acid metabolism by regulating the expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 y PROLINE DEHYDROGENASE2. *The Plant journal : for cell y molecular biology* **53**, 935-949.
- Hardie, D.G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**, 774-785.
- Harris, D.L. (1946). Phosphoprotein phosphatase, a new enzyme from the frog egg. *The Journal of biological chemistry* **165**, 541-550.
- Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., y Hardie, D.G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism* **2**, 9-19.
- Hedbacker, K., y Carlson, M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Frontiers in bioscience : a journal y virtual library* **13**, 2408-2420.
- Hey, S., Mayerhofer, H., Halford, N.G., y Dickinson, J.R. (2007). DNA sequences from Arabidopsis, which encode protein kinases y function as upstream regulators of Snf1 in yeast. *The Journal of biological chemistry* **282**, 10472-10479.
- Hofmann, K., y Bucher, P. (1996). The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends in biochemical sciences* **21**, 172-173.
- Hong, S.P., y Carlson, M. (2007). Regulation of snf1 protein kinase in response to environmental stress. *The Journal of biological chemistry* **282**, 16838-16845.
- Hong, S.P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., y Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 y mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8839-8843.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., *et al.* (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant physiology* **132**, 666-680.
- Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzone, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., y Witters, L.A. (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *The Journal of biological chemistry* **280**, 29060-29066.
- Jiang, R., y Carlson, M. (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes & development* **10**, 3105-3115.
- Jiang, R., y Carlson, M. (1997). The Snf1 protein kinase y its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Molecular y cellular biology* **17**, 2099-2106.

- Kang, Y., Vossler, R.A., Diaz-Martinez, L.A., Winter, N.S., Clarke, D.J., y Walters, K.J. (2006). UBL/UBA ubiquitin receptor proteins bind a common tetraubiquitin chain. *Journal of molecular biology* 356, 1027-1035.
- Kong, L.J., y Hanley-Bowdoin, L. (2002). A geminivirus replication protein interacts with a protein kinase y a motor protein that display different expression patterns during plant development y infection. *The Plant cell* 14, 1817-1832.
- Li, X.F., Li, Y.J., An, Y.H., Xiong, L.J., Shao, X.H., Wang, Y., y Sun, Y. (2009). AKINbeta1 is involved in the regulation of nitrogen metabolism y sugar signaling in Arabidopsis. *Journal of integrative plant biology* 51, 513-520.
- Lin, Y.Y., Lu, J.Y., Zhang, J., Walter, W., Dang, W., Wan, J., Tao, S.C., Qian, J., Zhao, Y., Boeke, J.D., *et al.* (2009). Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis. *Cell* 136, 1073-1084.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S., y Zhu, J.K. (2000). The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3730-3734.
- Lopez-Paz, C., Vilela, B., Riera, M., Pages, M., y Lumbreras, V. (2009). Maize AKINbetagamma dimerizes through the KIS/CBM domain y assembles into SnRK1 complexes. *FEBS letters* 583, 1887-1894.
- Lumbreras, V., Alba, M.M., Kleinow, T., Koncz, C., y Pages, M. (2001). Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO reports* 2, 55-60.
- Mair, W., Morantte, I., Rodrigues, A.P., Manning, G., Montminy, M., Shaw, R.J., y Dillin, A. (2011). Lifespan extension induced by AMPK y calcineurin is mediated by CRTC-1 y CREB. *Nature* 470, 404-408.
- Minokoshi, Y., Shiuchi, T., Lee, S., Suzuki, A., y Okamoto, S. (2008). Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)* 24, 786-790.
- Momcilovic, M., Hong, S.P., y Carlson, M. (2006). Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast y phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *The Journal of biological chemistry* 281, 25336-25343.
- Nath, N., McCartney, R.R., y Schmidt, M.C. (2003). Yeast Pak1 kinase associates with y activates Snf1. *Molecular y cellular biology* 23, 3909-3917.
- Nunes, C., Primavesi, L.F., Patel, M.K., Martinez-Barajas, E., Powers, S.J., Sagar, R., Feveireiro, P.S., Davis, B.G., y Paul, M.J. (2013). Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects y cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant physiology y biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 63, 89-98.
- Oakhill, J.S., Chen, Z.P., Scott, J.W., Steel, R., Castelli, L.A., Ling, N., Macaulay, S.L., y Kemp, B.E. (2010). beta-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, 19237-19241.
- Ortolan, T.G., Tongaonkar, P., Lambertson, D., Chen, L., Schaubert, C., y Madura, K. (2000). The DNA repair protein rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly. *Nature cell biology* 2, 601-608.

- Pang, T., Xiong, B., Li, J.Y., Qiu, B.Y., Jin, G.Z., Shen, J.K., y Li, J. (2007). Conserved alpha-helix acts as autoinhibitory sequence in AMP-activated protein kinase alpha subunits. *The Journal of biological chemistry* 282, 495-506.
- Polge, C., y Thomas, M. (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends in plant science* 12, 20-28.
- Rall, T.W., Wosilait, W.D., y Sutherland, E.W. (1956). The interconversion of phosphorylase a y phosphorylase b from dog heart muscle. *Biochimica et biophysica acta* 20, 69-76.
- Ramon, M., Ruelens, P., Li, Y., Sheen, J., Geuten, K., y Rolland, F. (2013). The hybrid four-CBS-domain KINbetagamma subunit functions as the canonical gamma subunit of the plant energy sensor SnRK1. *The Plant journal : for cell y molecular biology* 75, 11-25.
- Rao, R.S., Thelen, J.J., y Miernyk, J.A. (2014). In silico analysis of protein Lys-N(-) acetylation in plants. *Frontiers in plant science* 5, 381.
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rabissi, A., Lumbreras, V., Gonzalez-Guzman, M., *et al.* (2013). ABI1 y PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. *The Plant cell* 25, 3871-3884.
- Rolland, F., y Sheen, J. (2005). Sugar sensing y signalling networks in plants. *Biochemical Society transactions* 33, 269-271.
- Rubenstein, E.M., McCartney, R.R., y Schmidt, M.C. (2006). Regulatory domains of Snf1-activating kinases determine pathway specificity. *Eukaryotic cell* 5, 620-627.
- Shen, W., Reyes, M.I., y Hanley-Bowdoin, L. (2009). Arabidopsis protein kinases GRIK1 y GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant physiology* 150, 996-1005.
- Stein, S.C., Woods, A., Jones, N.A., Davison, M.D., y Carling, D. (2000). The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *The Biochemical journal* 345, 437-443.
- Steinberg, G.R., y Kemp, B.E. (2009). AMPK in Health y Disease. *Physiological reviews* 89, 1025-1078.
- Sugden, C., Crawford, R.M., Halford, N.G., y Hardie, D.G. (1999). Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases y phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop y is regulated by 5'-AMP. *The Plant journal : for cell y molecular biology* 19, 433-439.
- Sutherland, C.M., Hawley, S.A., McCartney, R.R., Leech, A., Stark, M.J., Schmidt, M.C., y Hardie, D.G. (2003). Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Current biology : CB* 13, 1299-1305.
- Tsugama, D., Liu, S., y Takano, T. (2012). A putative myristoylated 2C-type protein phosphatase, PP2C74, interacts with SnRK1 in Arabidopsis. *FEBS letters* 586, 693-698.
- Vahtomeri, K., y Makela, T.P. (2011). Molecular mechanisms of tumor suppression by LKB1. *FEBS letters* 585, 944-951.
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., y Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific β subunits y a novel glucose signaling mechanism. *Genes & development* 15, 1104-1114.

-
- Wang, D., Harper, J.F., y Gribkov, M. (2003). Systematic trans-genomic comparison of protein kinases between *Arabidopsis* y *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant physiology* 132, 2152-2165.
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M., y Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell metabolism* 2, 21-33.
- Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M., y Carling, D. (1994). Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase y regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *The Journal of biological chemistry* 269, 19509-19515.
- Xiao, B., Sanders, M.J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F.V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Haire, L.F., *et al.* (2011). Structure of mammalian AMPK y its regulation by ADP. *Nature* 472, 230-233.
- Yoshida, T., Fujita, Y., Maruyama, K., Mogami, J., Todaka, D., Shinozaki, K., y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2015). Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, cell & environment* 38, 35-49.
- Zeqiraj, E., Filippi, B.M., Deak, M., Alessi, D.R., y van Aalten, D.M. (2009). Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science (New York, NY)* 326, 1707-1711.
- Zheng, Z., Xu, X., Crosley, R.A., Greenwalt, S.A., Sun, Y., Blakeslee, B., Wang, L., Ni, W., Sopko, M.S., Yao, C., *et al.* (2010). The protein kinase SnRK2.6 mediates the regulation of sucrose metabolism y plant growth in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 153, 99-113.