



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN FUNCIONAL DEL DOMINIO DE UNIÓN A ALMIDÓN (SBD) DE
LAS SUBUNIDADES REGULADORAS AKIN β 1, AKIN β 2 Y AKIN β γ DEL
COMPLEJO SnRK1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA
ANA KAREN RUIZ GAYOSSO

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Martha Patricia Coello Coutiño
Facultad de Química, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Patricia León Mejía	Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Instituto de Biotecnología, UNAM	Facultad de Química, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Agosto, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis de Maestría se desarrolló bajo la supervisión de la Dra. Martha Patricia Coello Coutiño en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante el desarrollo de la investigación, esta fue evaluada por el Comité Tutor conformado por los siguientes investigadores:

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño	Facultad de Química, UNAM
Dra. Patricia León Mejía	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM

Los miembros del Jurado de Examen conformado por la Dra. María Soledad Funes Argüello, al Dr. Francisco Javier Plascencia de la Parra, a la Dra. Romina Rodríguez Sanoja, a la Dra. Aurora Lara Nuñez y a la Dra. María de la Paz Sánchez Jiménez, quienes revisaron este trabajo y aportaron valiosas ideas y comentarios.

También extendiendo este agradecimiento al Dr. Eleazar Martínez Barajas y al Biól. Carlos Mújica Jiménez por su constante asesoría, así como a la M. en C. Beatriz Alejandra Ávila Castañeda por su apoyo técnico y asesoría.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y al Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas; al igual que al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la Beca otorgada.

Para la realización de este proyecto se contó con el financiamiento obtenido de los proyectos PAPIIT IN216216, PAIP 5000-9126 y CONACyT 252001 y 252123.

RESUMEN

En las plantas, el complejo SnRK1 regula el balance energético y metabólico durante condiciones de alta demanda energética. Pertenece a una familia de cinasas, altamente conservada en eucariontes, que existe en forma de complejos heterotriméricos que constan de una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras β y γ . A nivel estructural, las subunidades reguladoras β contienen un dominio denominado SBD (Starch Binding Domain) en plantas o GBD (Glycogen Binding Domain) en mamíferos y levaduras, el cual es el responsable de la interacción con polisacáridos como el glucógeno en el caso de mamíferos y con el almidón almacenado por las plantas. En *Arabidopsis thaliana* están presentes tres subunidades (AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ) que conservan el SBD y que son capaces de unir *in vitro* a los gránulos de almidón.

Este polisacárido se encuentra almacenado al interior de los cloroplastos, sin embargo la localización subcelular de estas proteínas indica que hay una fracción importante en el citosol, donde aún no se ha descrito ninguna función relacionada con los carbohidratos solubles presentes en este compartimento. Como parte de los mecanismos que controlan la actividad de la cinasa, se ha descrito que diferentes azúcares solubles presentes en el citosol actúan como reguladores negativos de la cinasa, sin embargo se desconoce el mecanismo que tiene lugar. Una posibilidad es que interactúen directamente con las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ , sin embargo, experimentos preliminares de unión sugieren que estos azúcares no interactúan con las subunidades reguladoras. Estos mismos sugieren que la maltosa sí podría interactuar con las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ a través del SBD. El objetivo de este trabajo es caracterizar la unión de la maltosa a las subunidades reguladoras tipo β del complejo SnRK1 y determinar cuál es la influencia de esta unión en la actividad de la cinasa.

En los resultados del presente trabajo se demostró tanto por experimentos de retardo electroforético como por ensayos de fluorescencia que las subunidades AKIN β γ , AKIN β 1 y AKIN β 2 pueden unir a la maltosa a través del SBD en concentraciones micromolar y que además la actividad de SnRK1 en extractos proteicos de hojas se modifica por la presencia del disacárido.

ABREVIATURAS

ABI1	Abl interactor 1
ADP	Adenosine diphosphate, adenosín difosfato
AMP	Adenosine monophosphate, adenosín monofosfato
AMPK	AMP-activated kinase
AMY	α -amylase, α -amilasa
ASC	Association with SNF1 complex, asociación con el complejo SNF1
ATP	Adenosine triphosphate, adenosín trifosfato
BAM	β -amylase, β -Amilasa
CBM	Carbohydrate Binding Module, Módulo de Unión a Carbohidratos
CBS	Cystathionine β -synthase, Cistationina β -sintasa
CGTasa	Cyclodextrin-gluconotransferasa
DBE	Starch Debranching Enzyme, Enzima Desramificadora del Almidón
DPE1	Disproportionating Enzyme 1, Enzima Desramificadora 1
DPE2	Disproportionating Enzyme 2, Enzima Desramificadora 2
G1P	Glucose-1-phosphate, Glucosa-1-fosfato
G6P	Glucose-6-phosphate, Glucosa-6-fosfato
GBD	Glycogen binding domain, Dominio de Unión a Glucógeno
GFP	Green Fluorescence Protein, Proteína Verde Fluorescente
GH	Glycoside hydrolase, glucósido hidrolasa
GWD3	α -glucan water dikinase 3
HMG-CoAR	Hidroximetilglutaril CoA reductase
ISA3	Isoamylase 3, isoamilasa 3
KA1	Kinase-associated 1 domain
MBP	Maltose Binding Protein, Proteína de Unión a Maltosa
MEX1	Maltose Excess Protein 1
MOS	Maltooligosacáridos
npG3PDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante
NR	Nitrate reductase, nitrato reductasa
PHS1	Glucan phosphorylase 1, glucanofosforilasa 1
PHS2	Glucan phosphorylase 2, glucanofosforilasa 2
PP2CA	Protein phosphatase 2CA
PWD	Phophoglucan water dikinase

SBD	Starch binding domain, dominio de union a almidón
SEX4	Starch Excess 4
SHG	Soluble Heteroglycan, Heteroglucano soluble
SnAK1	SnRK1 activating kinase 1
SnAK2	SnRK1 activating kinase 2
SNF1	Sucrose non-fermenting 1
SnRK1	Sucrose non-fermenting related kinase 1
SPS	Sucrose phosphate synthase, sacarosa fosfato sintasa
T6P	Trehalose-6-phosphate, trehalosa-6-fosfato
TPS	Trehalose phosphate synthase, trehalosa fosfato sintasa
UBA	Ubiquitin-associated domain
α -CTD	C-terminal domain, dominio C-terminal

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	3
ABREVIATURAS	4
I. INTRODUCCIÓN	8
1. Funciones de la cinasa SnRK1.....	11
2. Estructura del complejo SnRK1	13
2.1. Subunidades α catalíticas	14
2.2. Subunidades tipo β	15
2.3. Subunidades tipo γ	15
2.4. Subunidades exclusivas de plantas	16
3. Regulación del complejo SnRK1	16
3.1. Regulación por modificaciones post-traduccionales.....	16
3.2. Otros niveles de regulación.....	18
4. El SBD de las subunidades reguladoras β	19
5. Relación del complejo SnRK1 con el almidón	23
6. El almidón en hojas	24
6.1. Degradación del gránulo de almidón.....	24
II. ANTECEDENTES INMEDIATOS	30
III. HIPÓTESIS	32
IV. OBJETIVOS	32
1. Objetivo General	32
2. Objetivos Particulares	32
V. MATERIALES Y MÉTODOS	33
1. Material vegetal.....	33
1.1. Germinación de las semillas y crecimiento de las plantas.....	33
2. Clonación del cDNA de AKIN β 1 y AKIN β 2 en el vector pET28b(+)	33
2.1. Amplificación del cDNA.....	33
2.2. Clonación en el vector de clonación pGEM-T Easy Vector	34
2.3. Clonación en el vector de expresión pET-28b(+)	34
3. Preparación de las células quimiocompetentes.....	35
4. Transformación de células competentes	35
5. Purificación del plásmido.....	36
6. Electroforesis en gel de agarosa	37

7. Obtención de la proteína recombinante.....	37
7.1. Sobreexpresión de la proteína recombinante.....	37
7.2. Purificación de la proteína recombinante	38
8. Cuantificación de proteína	40
9. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	40
10. Tinción de geles de poliacrilamida	41
11. Detección de proteínas mediante Western Blot	41
12. Ensayos de unión a maltosa.....	41
12.1. Geles de retardo	42
12.2. Ensayos de unión a maltosa	42
13. Actividad de SnRK1	43
VI. RESULTADOS.....	45
1. Clonación en el vector pET28b(+)	45
2. Obtención de las proteínas recombinantes.....	47
2.1. Sobreexpresión de las subunidades AKIN β 1 y AKIN β 2	47
2.2. Purificación de la proteína recombinante AKIN β 2	49
3. Ensayos de unión a maltosa	51
3.1. Geles de retardo	51
3.2. Ensayos de fluorescencia intrínseca	55
4. Actividad de SnRK1 en presencia de maltosa	58
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	60
VIII. CONCLUSIONES.....	66
IX. PERSPECTIVAS.....	67
X. ANEXOS	69
XI. BIBLIOGRAFÍA	75

I. INTRODUCCIÓN

En las plantas, la fotosíntesis es un proceso vital que se encuentra principalmente activo en hojas maduras. Los fotosintatos producidos mayoritariamente en forma de sacarosa, son transportados hacia el meristemo y órganos en desarrollo como son las raíces, las hojas jóvenes, las flores y las semillas donde posteriormente la sacarosa es usada para generar hexosas o bien, para ser almacenada en vacuolas o amiloplastos para un aprovechamiento a largo plazo (Rolland, Moore, & Sheen, 2002).

Los azúcares que se producen durante la fotosíntesis no sólo tienen un papel como sustratos del metabolismo energético y en la biosíntesis de polímeros estructurales. Aunque son la principal fuente energética y de carbono para constituir y abastecer a una célula, también se les han descrito importantes funciones señalizadoras en el control del metabolismo, el crecimiento y el desarrollo, así como la resistencia al estrés. Actualmente se sabe que los azúcares funcionan como los primeros mensajeros en diferentes vías de transducción de señales.

Debido a que las plantas están constantemente sujetas a cambios ambientales que comprometen la fotosíntesis, el monitoreo de los niveles energéticos y de carbohidratos es particularmente crítico para permitir la integración de señales celulares. Las respuestas rápidas que se generan para enfrentar las condiciones adversas son necesarias para continuar con el crecimiento y desarrollo. En muchas ocasiones, las células detectan el agotamiento energético y desencadenan rápidamente la activación o represión de genes en respuesta a diversas condiciones metabólicas a través de señales mediadas por azúcares (Xiao et al., 2000; Rolland et al., 2002; Rolland et al., 2006; Ramon et al., 2008).

El análisis de los patrones de expresión usando microarreglos de *Arabidopsis thaliana* en años recientes ha permitido la identificación de genes regulados por azúcares tanto en semillas como en hojas maduras (Bläsing et al., 2005). En estos, se reveló que existen cambios en los niveles de azúcares acompañados por alteraciones en los niveles de transcrito. Estos cambios, se hacen más evidentes en la mutante *pgm* (fosfoglucomutasa) que acumula bajos niveles de almidón pero que a diferencia de la planta del tipo silvestre contiene altas concentraciones de azúcares solubles durante el día, los cuales disminuyen dramáticamente al iniciar la noche. La correlación que muestran estos resultados, sugiere

que existen cambios transcripcionales en alrededor de 2000 genes, que son causados por variaciones en las concentraciones de azúcares. Por ejemplo, actualmente se sabe que los niveles de transcrito de los genes fotosintéticos alcanzan sus niveles más altos durante el mediodía, mientras que aquellos involucrados en el catabolismo de azúcares se transcriben mayoritariamente hacia el final del día. Por su parte, los relacionados con la movilización de reservas como el almidón, se transcriben durante la noche cuando decrecen los niveles de carbohidratos y se reprimen cuando hay suministro de sacarosa (Rolland et al., 2002).

Al analizar una serie de genes que se reprimen por la presencia de azúcares, se encontró que la transcripción de varios de estos se activa durante periodos de obscuridad, inanición de nutrientes y otras condiciones de estrés que repercuten en la tasa fotosintética y en consecuencia en las concentraciones de carbohidratos. Posteriormente, los perfiles de expresión de diversos genes en protoplastos provenientes de hojas de *A. thaliana* sometidos a diferentes condiciones de estrés, relacionaron al complejo con actividad de cinasa SnRK1 (Sucrose non-fermenting Related Kinase 1) con la reprogramación génica que tiene lugar en las células que son sometidas a concentraciones limitantes de carbohidratos debido a una tasa fotosintética reducida (Figura 1). En estas condiciones, se encontraron cerca de 700 genes que modifican su expresión por acción de SnRK1, es decir, algunos son co-activados por SnRK1 e inanición de azúcares y otros son co-reprimidos (Baena-González et al., 2007). Entre estos cambios resalta la inducción de genes catabólicos y la represión de genes implicados en rutas biosintéticas (Figura 1), con lo que se concluyó que el complejo SnRK1 participa en el restablecimiento de la homeostasis energética durante condiciones de estrés (Baena-González et al., 2007; Baena-González & Sheen, 2008).

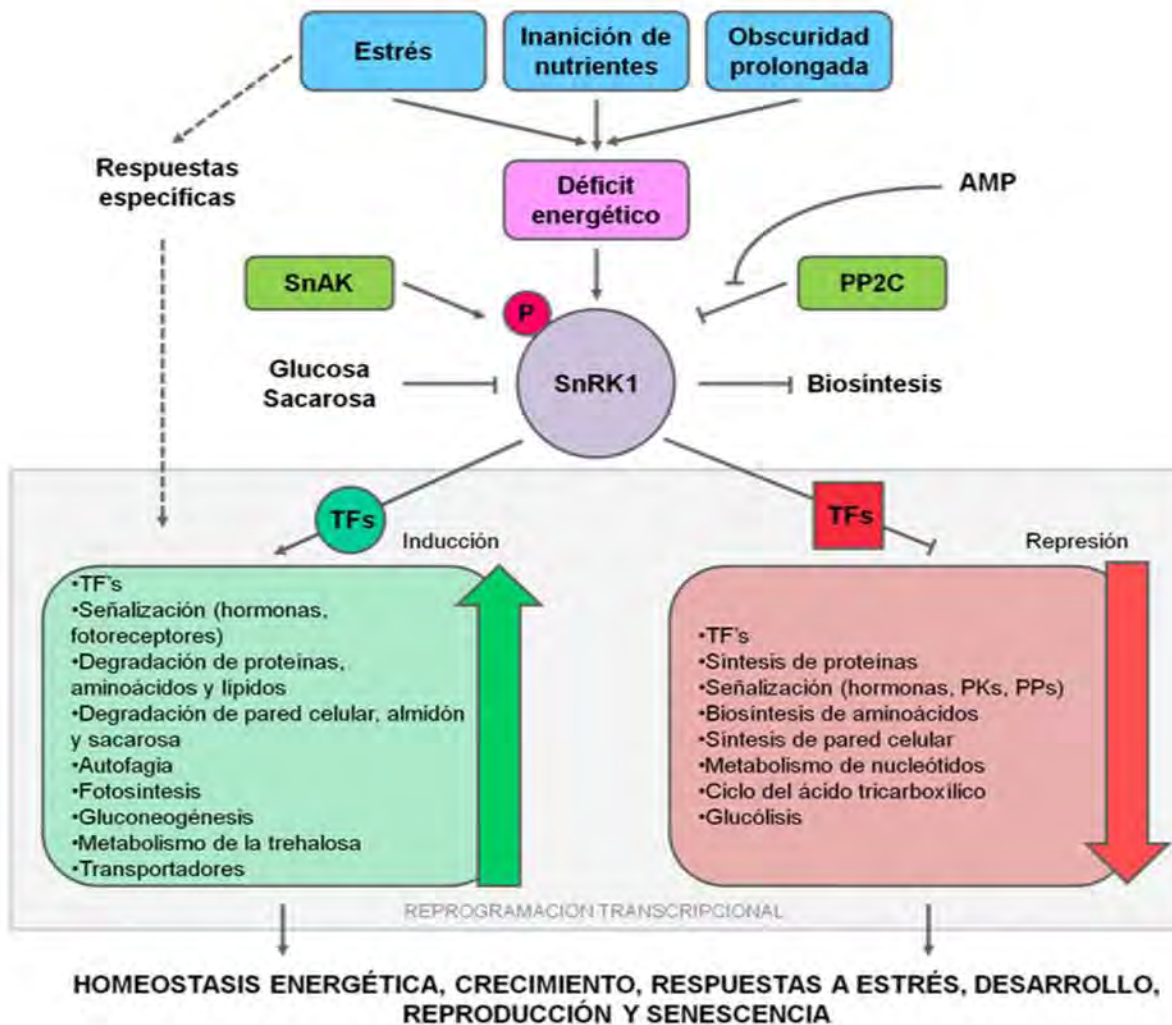


Figura 1. Estrés y deficiencia energética. Ciertos estados ambientales están relacionados con la deficiencia energética. Durante estas condiciones, el complejo SnRK1 es fosforilado por cinasas corriente arriba (SnAK) para mantenerlo activo, mientras que fosfatasas de la familia PP2C lo desfosforilan e inhibien. En un estado activo, la SnRK1 realiza la reprogramación de la transcripción de genes a través de factores transcripcionales (TFs) para reprimir o inducir la expresión de genes. O bien, puede inhibir la biosíntesis a través de la regulación de enzimas blanco. (Modificado de Baena-González & Sheen, 2008).

1. Funciones de la cinasa SnRK1

Los complejos proteicos con actividad de cinasa SnRK1 de plantas son considerados reguladores globales que controlan procesos para conservar energía y permitir la movilización de reservas (Ghillebert et al., 2011). Pertenecen a una familia de cinasas altamente conservada en eucariontes en la que se incluye también a la SNF1 (Sucrose non-fermenting 1) de levaduras y la AMPK (AMP-activated kinase) de mamíferos (Polge & Thomas, 2007).

En *Saccharomyces cerevisiae*, el gen *SNF1* se descubrió gracias a una serie de mutaciones que imposibilitan el crecimiento celular en sacarosa o fuentes de carbono no fermentables, razón de su nombre en inglés. La proteína cinasa SNF1, es necesaria para la adaptación a medios de crecimiento con concentraciones limitantes de glucosa, permitiendo que las células sean capaces de metabolizar fuentes alternativas de carbono como sacarosa, etanol y glicerol (Celenza & Carlson, 1986).

El ortólogo en mamíferos es la AMPK se identificó originalmente como una proteína cinasa que se activa alostéricamente por AMP (Adenosín monofosfato) y fosforila enzimas relacionadas con la síntesis de lípidos (Hardie et al., 1989). Se activa bajo condiciones que incrementan el índice AMP:ATP (Adenosín trifosfato), incluyendo la deficiencia de glucosa, la inanición de nutrientes, la hipoxia, el estrés oxidativo y la actividad física extenuante. Una vez activa, la proteína implementa un sistema de ahorro energético a través de la regulación directa de enzimas involucradas en procesos catabólicos que permitan obtener energía, mientras que limita los procesos biosintéticos (Hardie, 2009; Steinberg & Kemp, 2009). Ahora también se sabe que la AMPK está involucrada en la regulación del balance energético a nivel sistémico, respondiendo a señales hormonales y de nutrientes que modulan la ingesta de alimentos y el gasto energético, así como el flujo y metabolismo de los sustratos energéticos (Kahn et al., 2005).

En plantas, la SnRK1 comparte características funcionales y estructurales con sus ortólogos SNF1 y AMPK. La primera evidencia de la conservación de la SnRK1 y su participación como regulador del metabolismo surgió a partir de ensayos de complementación en una mutante de levadura $\Delta snf1$ con el cDNA de la SnRK1. Dicha complementación restablece la utilización de fuentes alternativas de carbono, sugiriendo que la cinasa de plantas puede sustituir a la SNF1 en la cascada de señalización que

permite la expresión de genes para la utilización de fuentes alternas de carbono (Alderson et al., 1991).

Las SnRK1 regulan tanto la expresión génica como la actividad de ciertas enzimas en respuesta al déficit energético. Controlan el metabolismo de carbohidratos debido a que modulan la reprogramación transcripcional de genes como el de la sacarosa sintasa que participa en la degradación de la sacarosa y la α -amilasa, enzima clave para la degradación del almidón (Purcell et al., 1998; Laurie et al., 2003). Cuando la SnRK1 está activa (Figura 1), induce la expresión de genes involucrados en procesos catabólicos de proteínas, lípidos y aminoácidos así como de la pared celular y el almidón (Baena-González & Sheen, 2008). De manera muy importante, además del control en los niveles de trehalosa-6-fosfato (T6P) a través de la regulación enzimática, la SnRK1 también induce la expresión de los genes *TPS8-11*, involucrados en el metabolismo de la trehalosa (Baena-González & Sheen, 2007). Sumado a la inducción de genes, la SnRK1 también reprime los niveles de expresión de ciertos genes como aquellos involucrados en la biogénesis de ribosomas y del anabolismo (Figura 1).

Como regulador enzimático, las SnRK1 están involucradas en el control del metabolismo a través de fosforilaciones directas que modifican la actividad enzimática de los blancos (Halford & Hey, 2009). Una clara evidencia sobre este fenómeno es el efecto que tiene la fosforilación de SnRK1 sobre enzimas importantes en vías del metabolismo de la planta. Por ejemplo, se han descrito como blancos *in vitro* de la SnRK1 a la HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa) que participa en la síntesis de esteroides, la SPS (sacarosa fosfato sintasa) que se relaciona con la síntesis de sacarosa, la NR (nitrato reductasa) involucrada en la asimilación de nitrógeno (Sugden et al., 1999b) y la TPS (trehalosa-fosfato sintasa) encargada de la síntesis de T6P. Otro ejemplo de la fosforilación llevada a cabo por SnRK1 en enzimas del metabolismo, es la npG3PDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante), una enzima que cataliza la oxidación irreversible de gliceraldehído-3-fosfato a 3-fosfoglicerato usando NADP^+ para generar NADPH (Piattoni et al., 2011; Trejo-Fregoso, 2015).

Sumado a las respuestas inducidas por estrés, la cinasa SnRK1, también participa en procesos fundamentales de desarrollo. De estos últimos, se ha demostrado que la SnRK1 está involucrada en la regulación del ciclo celular, en procesos como la maduración de las

semillas, en la germinación, el desarrollo del embrión y el crecimiento de los cotiledones, la generación de brotes, la floración, la reproducción (desarrollo del polen) y la senescencia (Lumbreras et al., 2001; Zhang et al., 2001; Rolland et al., 2002; Lovas et al., 2003; Wingler et al., 2009; Radchuk et al., 2010; Guérinier et al., 2013). Estudios fenotípicos de mutantes que tienen una elevada actividad de SnRK1 indican que estas plantas son capaces de desarrollarse en medios deficientes de glucosa y en condiciones de luz reducida, lo que disminuye la tasa fotosintética. Mientras que las plantas del tipo silvestre entran al estadio de senescencia rápidamente, las mutantes sobreviven durante más tiempo (Baena-González et al., 2007).

2. Estructura del complejo SnRK1

Estructuralmente, la familia de cinasas SNF1/AMPK/SnRK1 se encuentra en forma de un heterotrímero compuesto por una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras, una de tipo β y otra de tipo γ (Hardie, 2007).

El genoma de *S. cerevisiae* contiene un gen para la subunidad catalítica (*Snf1*), tres genes para las subunidades SNF1 β (*Sip1*, *Sip2* y *Gal83*) y un gen para la subunidad SNF1 γ (*Snf4*). En mamíferos existen dos genes que codifican para la subunidad catalítica (AMPK α 1 y AMPK α 2), dos para las subunidades reguladoras β (AMPK β 1 y AMPK β 2) y tres genes de las subunidades γ (AMPK γ 1, AMPK γ 2 y AMPK γ 3). En plantas, las subunidades del complejo SnRK1 se han descrito en diferentes especies como maíz (*Zea mays*), espinaca (*Spinacia oleracea*), arroz (*Oryza sativa*), papa (*Solanum tuberosum*), cebada (*Hordeum vulgare*), chícharo (*Pisum sativa*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Zhang et al., 2001; Lumbreras et al., 2001; Lovas et al., 2003; Radchuk et al., 2010; Coello & Martínez-Barajas, 2016). En *A. thaliana* existen tres genes para las subunidades catalíticas, pero sólo dos de ellos se expresan (AKIN10/SnRK1.1 y AKIN11/SnRK1.2) en las hojas, dos genes para las subunidades SnRK1 β (AKIN β 1 y AKIN β 2) y dos genes para las subunidades γ (AKIN γ 1 y AKIN γ 2) (Ghillebert et al., 2011). En plantas, se ha descrito la existencia de dos genes exclusivos (Figura 2). El primero de ellos, codifica para la subunidad denominada AKIN $\beta\gamma$, que comparte características estructurales del N-terminal de una subunidad β y el C-terminal de una subunidad γ (Lumbreras et al., 2001). El segundo, codifica para la subunidad AKIN β 3 (Gissot et al., 2004).

2.1. Subunidades α catalíticas

Las subunidades catalíticas del complejo SnRK1 son las responsables de llevar a cabo las fosforilaciones necesarias a lo largo de las cascadas de señalización en las que están involucradas. Entre sus características principales (Figura 2) resalta un dominio catalítico altamente conservado en el N-terminal (Hardie, 2007) que tiene un plegamiento canónico de 11 subdominios donde se localiza el asa de activación (T-loop), que es fosforilada por cinasas corriente arriba en una treonina (T) altamente conservada. En las subunidades catalíticas de *A. thaliana*, esta T corresponde a la T175 en AKIN10/SnRK1.1 y la T176 en AKIN11/SnRK1.2 (Harthill et al., 2006; Shen et al., 2009; Crozet et al., 2010). Estas subunidades presentan un alto grado de conservación entre las especies en las que se han estudiado, tienen una identidad cercana al 48%, pero si se restringe el análisis al dominio de cinasa, el porcentaje de identidad aumenta al 60 y 65% respecto a sus ortólogos en los otros reinos eucariontes (Carling et al., 1994; Halford & Hay, 2009).

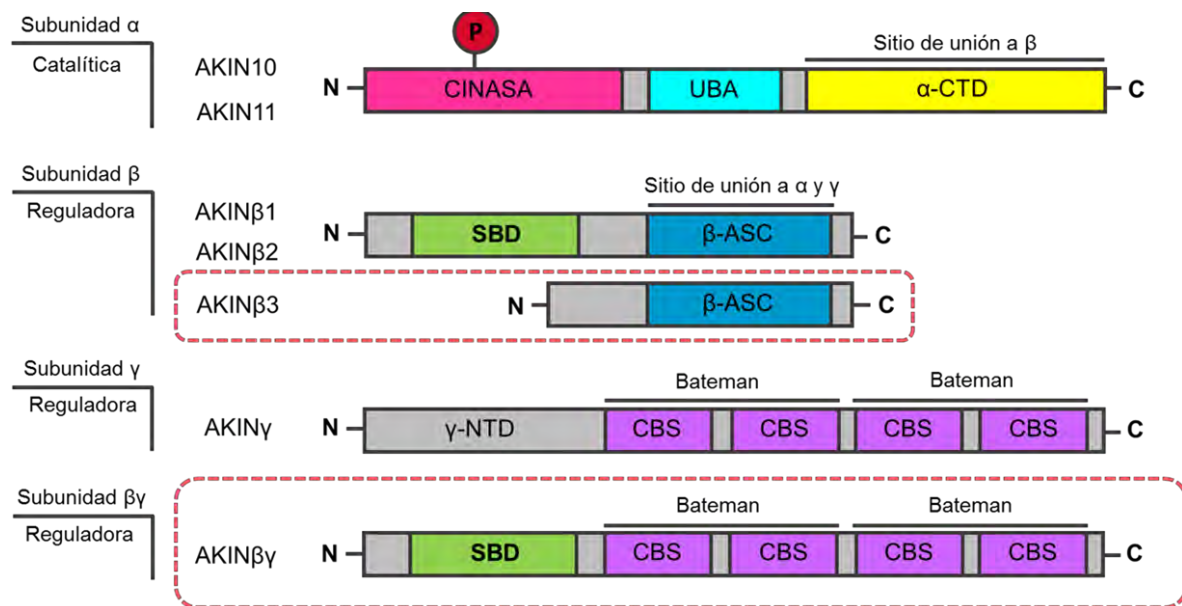


Figura 2. Estructura de las subunidades que conforman el complejo SnRK1 en *A. thaliana*. En *A. thaliana* existen 7 genes que codifican para las subunidades (AKIN10, AKIN11, AKIN β 1, AKIN β 2, AKIN β 3, AKIN γ y AKIN $\beta\gamma$) que se organizan en heterotrímeros para formar un complejo activo. UBA (Ubiquitin-associated Domain), α -CTD (C-terminal Domain), SBD (Starch Binding Domain), β -ASC (Association with SNF1 complex), γ -NTD (N-terminal Domain) y CBS (Cystathionine β -synthase motif). El recuadro rojo de línea discontinua señala las subunidades exclusivas de plantas. (Modificado de Hardie, 2007).

Hacia la parte media de las subunidades AKIN10/SnRK1.1 y AKIN11/SnRK1.2 de *A. thaliana*, está presente un dominio UBA (Ubiquitin-associated domain) que se ha propuesto como mediador en la interacción con proteínas ubiquitinadas (Figura 2), pero del cual no se tiene mucha información. Además, cercano a esta región se encuentra un dominio KA1 (Kinase-associated 1 domain) que se postula permite la interacción con fosfatasa que regulan la actividad del complejo (Kleinow et al., 2000; Amodio et al., 2007; Xiao et al., 2011; Rodrigues et al., 2013). En el C-terminal hay una región denominada α -CTD (C-terminal domain) que es la encargada de unirse a la subunidad β para formar el complejo.

2.2. Subunidades tipo β

Se considera que las subunidades tipo β (AKIN β 1 y AKIN β 2) tienen dos funciones principales. La primera de ellas es participar en el ensamblaje del complejo al servir como andamios para la unión con las otras subunidades y la segunda es regular al complejo. En estas subunidades resalta la presencia de dos dominios (Figura 2). El primero de ellos, localizado en el C-terminal, es el dominio ASC (Association with SNF1 complex). Este dominio es importante para la interacción con las subunidades α y γ , permitiendo la formación del heterotrímero (Polge & Thomas, 2007; Ghillebert et al., 2011).

El segundo dominio está especializado en la unión a carbohidratos y se denomina GBD (Glycogen Binding Domain) en mamíferos y levaduras o SBD (Starch Binding Domain) en plantas (Figura 2) debido a que es el responsable de la interacción *in vitro* del complejo con la molécula de glucógeno en mamíferos y levaduras o con el almidón en plantas (Polekhina et al., 2003; Wiatrowski et al., 2004; McBride et al., 2009; Ávila-Castañeda et al., 2014).

2.3. Subunidades tipo γ

A nivel estructural, las subunidades γ , constan de un dominio γ -NTD (N-terminal domain) y cuatro motivos Cistationina β -sintasa (CBS) en el C-terminal (Figura 2). Estos motivos forman dos dominios Bateman que permiten la unión a nucleótidos de adenina como el AMP, ADP (Adenosín difosfato) y ATP (Hardie, 2007; Scott, 2004; Xiao et al., 2007; Maya-Bernal et al., 2017), por lo que se considera que estas subunidades actúan como sensores del estado energético de la célula. En los experimentos de complementación realizados en la mutante de levadura $\Delta snf4$ con el cDNA de AKIN γ , no se pudo recuperar el fenotipo de crecimiento en fuentes fermentables de carbono, lo cual sugiere que la subunidad de plantas no puede sustituir a la Snf4 (Gissot et al., 2004).

2.4. Subunidades exclusivas de plantas

Adicionalmente a las típicas subunidades presentes también en mamíferos y levaduras, en plantas se han descrito un par de genes que codifican para proteínas que forman parte del complejo SnRK1 pero que tienen características estructurales particulares.

Por un lado existe una subunidad β atípica en *A. thaliana* que carece naturalmente del SBD (Figura 2) y que es llamada AKIN β 3. Por experimentos de complementación usando a la levadura mutante $\Delta gal83\Delta sip1\Delta sip2$ donde se recupera el fenotipo, se pudo determinar que, al igual que AKIN β 1 y AKIN β 2, la subunidad AKIN β 3 puede servir de andamio para la formación del complejo sin importar la ausencia del SBD. (Gissot et al., 2004; Gissot et al., 2006).

Por otro lado, la subunidad AKIN $\beta\gamma$ exclusiva de plantas, consta de un N-terminal característico de una subunidad tipo β , incluido el SBD, y un C-terminal con cuatro CBS presentes en las subunidades γ . La complementación de una levadura mutante $\Delta snf4$ con el cDNA de la subunidad AKIN $\beta\gamma$, restablece el fenotipo, sugiriendo que en plantas, la subunidad AKIN $\beta\gamma$ tiene funciones similares a una típica subunidad γ (Ramon et al., 2013).

3. Regulación del complejo SnRK1

Debido a la variedad de procesos en los que participa la cinasa SnRK1 no es extraño que los mecanismos que regulan la actividad del complejo sean igual de variados y al mismo tiempo especializados (Figura 3). De hecho, se han descrito varias maneras en las que se puede regular la actividad del heterotrímero según el estatus energético de las células.

3.1. Regulación por modificaciones post-traduccionales

El mecanismo de regulación de la actividad más estudiado es el de la fosforilación/desfosforilación del asa de activación (T-loop) presente en las subunidades catalíticas (Figura 3). La activación del complejo SnRK1 conlleva la fosforilación de la T175 en AKIN10/SnRK1.1 y de la T176 en AKIN11/SnRK1.2. Este proceso lo llevan a cabo cinasas corriente arriba identificadas como SnAK1 y SnAK2 (SnRK1 Activating Kinase 1 y 2) en *A. thaliana* (Harthill et al., 2006; Shen et al., 2009; Crozet et al., 2010). Esta T fosforilada se encuentra conservada en las subunidades catalíticas de diferentes especies

eucariontes, incluidos los mamíferos y las levaduras, donde se ha visto que la fosforilación funciona como un mecanismo de activación del complejo. Por otro lado, existen datos reportados de *Solanum berthaultii*, donde fue posible identificar la fosforilación en la S174 de la subunidad catalítica SbSnRK1 α en presencia de SnAK2 de *A. thaliana* (Lin et al., 2015). Estas evidencias sugieren que en las cinasas SnRK1 de plantas existen sitios de fosforilación que no se han identificado y de los cuales se desconoce su función biológica.

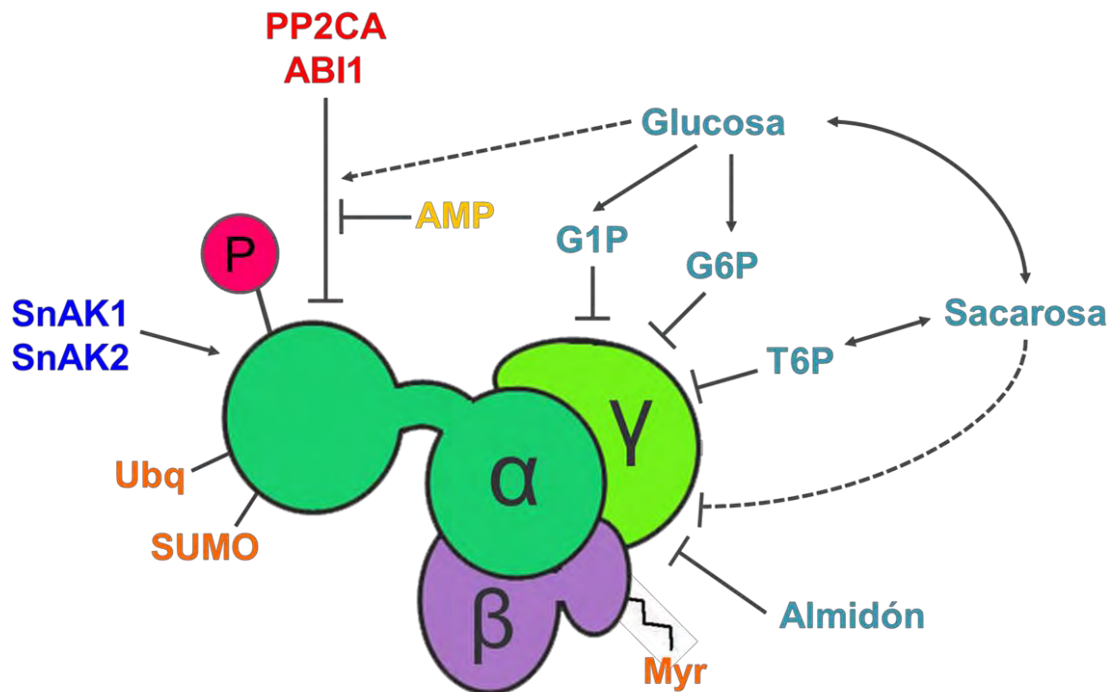


Figura 3. Regulación del complejo SnRK1. La regulación del complejo se da a diferentes niveles que incluyen la fosforilación por cinasas río arriba (SnRK1 Activating Kinase 1 y 2, SnAK1 y SnAK2, en azul) y fosfatasas (en color rojo) que lo desfosforilan e inactivan. (PP2CA y ABI1). Al mismo tiempo, otras modificaciones post-traduccionales (en color naranja) como la SUMOilación (SUMO), la ubiquitinación (Ubq) y la miristoilación (Myr) también han sido reportadas. Metabolitos como el AMP (amarillo) o algunos carbohidratos (azul claro) como la G1P (Glucosa-1-fosfato), la G6P (Glucosa-6-fosfato) y la T6P (Trehalosa-6-fosfato) pueden inhibir a la cinasa (Modificado de Crozet et. al., 2014).

Contrario a la fosforilación, se sabe que la desfosforilación funciona como un mecanismo de inhibición. Se ha sugerido que la responsable de la desfosforilación de la T175/176 es una proteína de la familia PP2C (Figura 3). Los estudios iniciales encargados de su identificación, proponen a las fosfatasas PP2CA y ABI1 como parte de este mecanismo de regulación (Rodriguez et al., 2013).

A pesar de que la fosforilación/desfosforilación del T-loop es considerado el mecanismo de regulación más importante del complejo SnRK1, otras modificaciones post-traduccionales también han sido reportadas. De estas, se sabe que la ubiquitinación y la SUMOilación de las subunidades catalíticas controlan la estabilidad del complejo y en consecuencia su actividad. Se ha reportado que la subunidad AKIN10/SnRK1.1 es ubiquitinada para su degradación vía proteosoma en condiciones de deficiencia nutrimental (Ananieva et al., 2008). De manera similar, se ha descrito que esta subunidad puede interactuar con la conjugasa E2 SUMO y que efectivamente puede estar SUMOilada, sugiriendo que este mecanismo actúa como un regulador de la estabilidad (Elrouby & Coupland, 2010; Crozet et al., 2016).

Además de las modificaciones que pueden tener lugar en las subunidades catalíticas, se tiene conocimiento de algunas más que ocurren en las subunidades reguladoras. La N-miristoilación de las subunidades AKIN β 1 y AKIN β 2 aparentemente tiene un papel importante en la regulación de la actividad de cinasa. Se ha sugerido que la N-miristoilación actúa como un regulador negativo, al mantener a las subunidades reguladoras ancladas en las membranas celulares (Pierre et al., 2007).

3.2. Otros niveles de regulación

La regulación por adenilatos se ha reportado en los complejos SNF1, AMPK y SnRK1 (Sugden et al., 1999a; Oakhill et al., 2011; Xiao et al., 2011). Los estudios más completos se han realizado en AMPK, donde se demostró que el AMP activa alostéricamente a la cinasa a través de la unión con la subunidad AMPK γ . Esta unión le confiere a la cinasa una conformación terciaria que le permite ser un mejor sustrato para las cinasas corriente arriba, pero que impide la actividad de las fosfatasas. De esta manera, la cinasa permanece fosforilada y activa (Oakhill et al., 2011; Xiao et al., 2011; Zhang et al., 2013). En mamíferos se sabe que dos de los cuatro CBS (1 y 3) de la subunidad AMPK γ pueden unir adenilatos de manera reversible (Scott, 2004; Xiao, 2007) y el número 4 puede unir AMP de manera no intercambiable, es decir que el AMP se encuentra fijo (Xiao, 2011).

En el caso particular de las plantas, usando complejos purificados de hojas de espinaca, se demostró que el AMP protege a la cinasa de la desfosforilación por parte de la fosfatasa recombinante PP2C de mamíferos (Sugden et al., 1999). Experimentos que se han

realizado en nuestro grupo de investigación, sugieren que la subunidad AKIN β puede unir a moléculas de AMP, ADP y ATP con constantes de disociación variables entre cada nucleótido pero aparentemente en un solo sitio en la proteína (Maya Bernal et al., 2017).

Por otra parte, la actividad de SnRK1 puede verse afectada por azúcares (Figura 3) como la T6P, la glucosa-6-fosfato (G6P), la glucosa-1-fosfato (G1P), la glucosa y la sacarosa. En las plantas, la T6P es considerada como uno de los reguladores con más influencia sobre la SnRK1. Este metabolito se encuentra en muy bajas concentraciones en tejidos vegetales, donde tiene funciones señalizadoras (Schluepmann et al., 2012), su acumulación está estrechamente relacionada con la cantidad de sacarosa presente en el tejido. Estudios del efecto inhibitorio de los azúcares fosfato, demostraron que el mayor efecto en la actividad de SnRK1 tiene lugar en presencia de T6P, seguido por la G1P y la G6P. La G1P además actúa sinérgicamente a la T6P para inhibir la actividad de SnRK1. El mecanismo a través del cual tienen efecto estos azúcares no es claro, pero una posibilidad es la participación de un intermediario presente en semillas y tejido joven, pero que se encuentra aparentemente ausente en tejido maduro (Nunes et al., 2013).

En estudios posteriores se comprobó que los polisacáridos, en particular el almidón, tienen un efecto inhibitorio en la actividad de SnRK1 (Figura 3), lo que concuerda con el efecto negativo que tiene el glucógeno en la actividad de los complejos AMPK (McBride, et al., 2009). Esta inhibición aparentemente está mediada por el GBD de las subunidades AMPK β y SnRK1 β con las que se ha demostrado la interacción con los polisacáridos de reserva (McBride et al., 2009; Ávila-Castañeda et al., 2014).

4. El SBD de las subunidades reguladoras β

Los Dominios de Unión a Almidón (SBD) se localizan en un gran número de proteínas que pueden unir almidón, glucógeno o carbohidratos relacionados a esta estructura y son clasificados en diferentes familias de Módulos de Unión a Carbohidratos (CBM, Carbohydrate-Binding Module) (Christiansen et al., 2009; Janecek et al., 2011).

La longitud de un SBD es en promedio de 100 residuos de aminoácidos y han sido encontrados en enzimas tanto amilolíticas como no amilolíticas (Christiansen et al., 2009), en donde se considera que les confiere la habilidad de unirse fuertemente al almidón,

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

Los GBD de las subunidades SNF1 β , AMPK β y el SBD de SnRK1 β son miembros de la familia CBM48. En *Rattus norvegicus* se ha demostrado que el dominio GBD de la subunidad AMPK β 1 es capaz de unirse, *in vitro*, al glucógeno y que regula la actividad de AMPK cuando se une a los puntos de ramificación (enlaces α -1,6) de la molécula de glucógeno (Polekhina et al., 2003; McBride et al., 2009; Koay et al., 2010). También se ha propuesto que la función de este dominio es localizar al complejo cerca de proteínas blanco, debido a que las subunidades AMPK β co-inmunoprecipitan con proteínas que se encuentran unidas al glucógeno y que son reguladas por la AMPK, como es la glucógeno fosforilasa (Vincent, et al., 2001; Wojtaszewski et al., 2002; Hedbacker et al., 2004; Sakoda et al., 2005).

La estructura cristalográfica del GBD de AMPK β 1 (*R. norvegicus*) en presencia de β -ciclodextrina, reveló que en la unión proteína-glucógeno participan varios aminoácidos entre los que se encuentran W100, K126, W133 y N150 (Figura 4.A), cuya función se confirmó por mutaciones que resultaron en la pérdida de la unión con el glucógeno (Figura 4.B) (Polekhina et al., 2005; McBride et al., 2009). El papel que juega el SBD de las subunidades SnRK1 β y su estructura no ha sido estudiado a profundidad, pero el análisis de la secuencia del SBD y la comparación con el GBD de AMPK β 1 revelaron que las subunidades SnRK1 β de *A. thaliana* conservan algunos de los aminoácidos que participan en la unión proteína-glucógeno en mamíferos (Figura 5.A) (Christiansen et al., 2009; Ávila-Castañeda et al.,

2014). El análisis de los modelos tridimensionales de las estructuras del SBD de las subunidades AKIN β 2 y AKIN β γ , utilizando a la β -ciclodextrina como ligando, sugiere que estos tienen una topología muy parecida al GBD de AMPK β 1 (Figura 5.B). Por otra parte, ciertas mutaciones en algunos de los aminoácidos de AKIN β γ (Figura 6.A) que en mamíferos son importantes para la unión con el glucógeno, provocan la pérdida parcial de la unión con el almidón, aunque no la abaten completamente (Gutiérrez-Granados, 2012). Sin embargo, la delección del SBD en la proteína AKIN β γ (AKIN β γ - Δ SBD) hace que se pierda completamente la unión con el almidón proveniente de hojas de *A. thaliana* (Figura 6.B), confirmando que la interacción proteína-almidón se da a través del SBD (Gallegos-Pacheco, 2016).

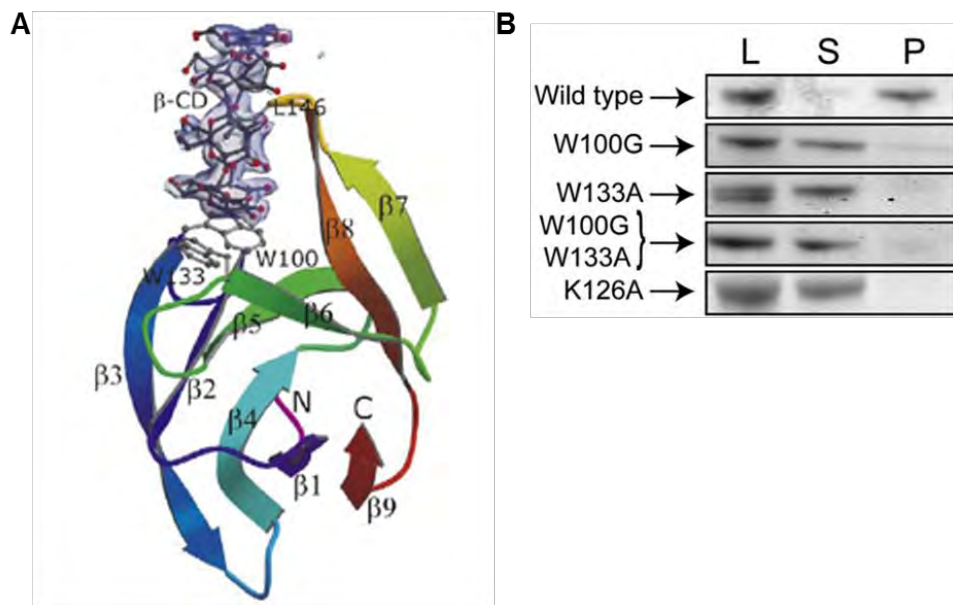


Figura 4. El GBD de la subunidad AMPK β 1 de *R. norvegicus*. (A) Estructura cristalográfica del GBD de la subunidad AMPK β 1, donde se muestran algunos residuos que participan en la interacción con la β -ciclodextrina (β -CD) como el W100 (triptófano) y el W133. (B) Ensayo de unión al glucógeno que se demuestra que las mutaciones puntuales en algunos aminoácidos abaten la unión con el polisacárido, donde se puede ver a la proteína utilizada en el ensayo (L), la fracción no unida o sobrenadante (S) y la fracción unida o pastilla (P) (Tomado de Polekhina et al., 2005 y McBride et al., 2009)

En ensayos de interacción *in vitro*, para evaluar la capacidad de unión al almidón proveniente de *A. thaliana*, papa (*S. tuberosum*) y frijol (*P. vulgaris*), se demostró que las subunidades AKIN β 2 y AKIN β γ son capaces de unirse a los gránulos, aunque la unión

disminuye en presencia de almidón con un menor porcentaje de amilopectina (Ruiz-Gayosso, 2015), lo que sugiere que la interacción

A

```

A. thaliana AKINβ1 (92-178) FDNPPEQ-GIPTIITWNQGGNDVAVEGSWDNWRSR---KKLQKSGKDHSLFLVLPSTGIYHYKVIVDGESKYIPDLPFVADEGVNVCNII-DV
A. thaliana AKINβ2 (94-180) EEASNEQ-GIPTMITWCHGGKEIAVEGSWDNWKTR---SRLQRSKDFDTIMKVLPSGVYIYRFIVDQWRHAPLPLARDAGNTFNIL-DL
A. thaliana AKINβγ (12-120) NSAAAGQLLTPTRFVWPYGGRRVFLSGSFTRWTEHVPMSPLEGCTVFQVICNLTPGYHYKFFDVGEWRHDEHQPFVSGNGGVVNTIFITG
R. norvegicus AMPKβ1 (70-154) FEKAPAQ-ARPTVFRWTGGGKEVYLSGSFHNWSK----LPLTRSQNNFVAILDLPEGEHQYKFFVDGQWTHDPSEPIVTSQLGTVNNI-I-QV

```

B

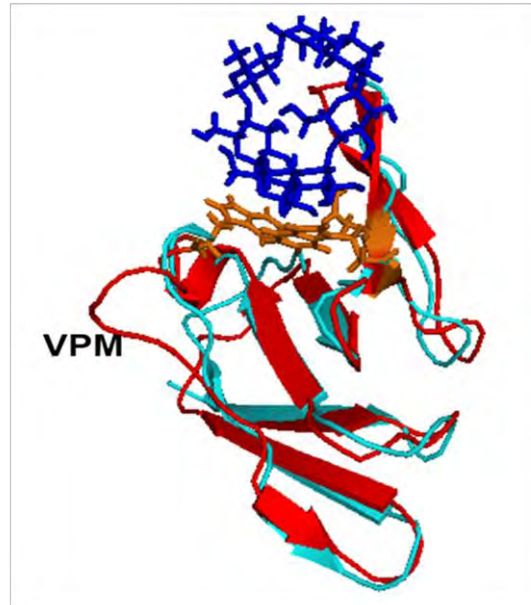


Figura 5. Comparación del SBD de SnRK1 con el GBD de AMPK. (A) Alineamiento de las secuencias del SBD de las subunidades SnRK1β de *A. thaliana* y el GBD de AMPKβ1 de *R. norvegicus*. Los aminoácidos relevantes para la unión se con asteriscos rojos, de estos se resaltan en colores los aminoácidos conservados en las proteínas de plantas respecto a la de rata. (B) Predicción de la estructura terciaria de las subunidades AKINβ2 (cian) y AKINβγ (rojo) en presencia de β-ciclodextrina (azul). Resalta una inserción de tres aminoácidos (VPM) presente en AKINβγ (Tomado de Ávila-Castañeda et al., 2014).

Se ha comprobado por experimentos de interacción *in vitro*, que las subunidades AKINβ1, AKINβ2 y AKINβγ pueden unir almidón y que esta unión resulta en una disminución significativa de la actividad de SnRK1, efecto que no se observa en presencia de una muestra comercial con un alto porcentaje de amilosa (Ávila-Castañeda et al., 2014; Ruiz-Gayosso, datos no publicados). Esta mezcla contiene 70% de amilosa, molécula lineal compuesta por glucosas unidas por enlaces α-1,4, a diferencia del almidón de *A. thaliana* que solamente contiene cerca del 30% de amilosa y el resto amilopectina, que presenta un

mayor número de ramificaciones dadas por los enlaces α -1,6 (Streb & Zeeman, 2012). Estos datos sugieren que los enlaces α -1,6 son los puntos en los que las subunidades tipo β pueden unirse al almidón y de esta manera regular la actividad del complejo.

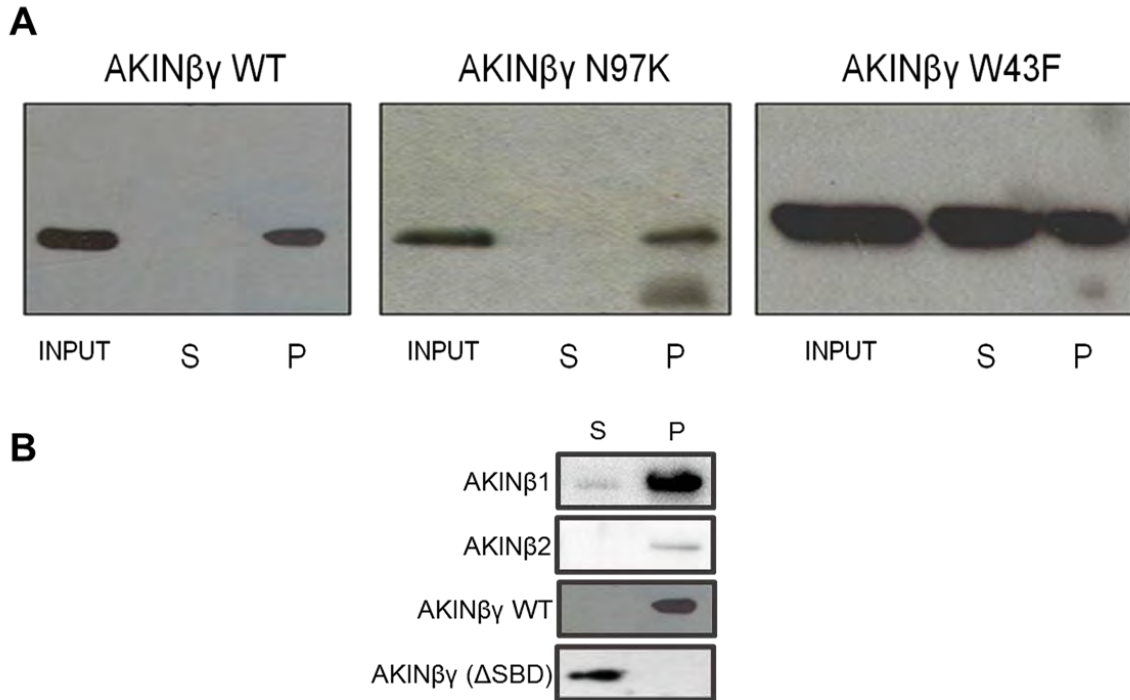


Figura 6. Unión de las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN $\beta\gamma$ con el almidón. (A) Ensayos *in vitro* de unión al almidón de la subunidad AKIN $\beta\gamma$ y sus versiones con mutaciones, donde el sobrenadante (S) representa a la fracción no unida y los gránulos insolubles de almidón que precipitan (P), la fracción unida. La mutación N97K no afecta la unión con el almidón mientras que W43F la abate parcialmente, encontrando una fracción de AKIN $\beta\gamma$ en el sobrenadante. (B) De manera similar a lo que ocurre con AKIN $\beta\gamma$, las subunidades AKIN β 1 y AKIN β 2 pueden unir almidón, éstas se encuentran en la fracción unida a los gránulos de almidón (P). Mientras que la proteína carente del SBD (Δ SBD) se detecta en la fracción no unida (sobrenadante, S) (Tomado de Gutiérrez-Granados, 2012; Ávila-Castañeda et al., 2014; Gallegos-Pacheco, 2016).

5. Relación del complejo SnRK1 con el almidón

Actualmente existe información sobre la relación que hay entre el complejo SnRK1 y el metabolismo del almidón. Como primera evidencia, se pueden mencionar los experimentos realizados en granos de polen provenientes de plantas transgénicas de cebada que tienen una expresión disminuida del gen de la subunidad catalítica, los cuales no acumulan

almidón, comprometiendo su maduración y viabilidad. Estos datos evidenciaron que la subunidad catalítica es indispensable para la acumulación de almidón en los granos de polen (Zhang et al., 2001).

Por otra parte, la generación de plantas mutantes *akin10/snrk1.1* muestra que estas líneas movilizan menos almidón durante la noche que las del tipo silvestre en condiciones de deficiencia de fósforo (Fragoso et al., 2009). Además, experimentos en *A. thaliana* con una reducción transitoria en la expresión de AKIN10/SnrRK1.1 y AKIN11/SnrRK1.2 determinaron que las plantas mutantes acumulan una mayor cantidad de almidón al finalizar la noche comparadas con las del tipo silvestre, (Baena-González et al., 2007). Estos datos sugieren que el complejo SnRK1 está regulando directa o indirectamente el metabolismo del almidón, particularmente durante la degradación.

Existe evidencia donde fue posible encontrar, por inmuno detección, a las subunidades AKIN10/SnrRK1.1, AKIN11/SnrRK1.2 y AKIN $\beta\gamma$ asociadas directamente a gránulos de almidón aislados de hojas de *A. thaliana* (Ávila-Castañeda et al., 2014). Por otro lado, se demostró, por inmunolocalización acoplada a partículas de oro en cortes ultra finos que tanto la subunidad AKIN $\beta\gamma$ como AKIN $\beta 3$, se encuentran asociadas *in vivo* a los gránulos de almidón (Ruiz-Gayosso, datos no publicados). Debido a que únicamente la subunidad AKIN $\beta\gamma$ contiene un dominio que le permite interactuar con el polisacárido, se ha propuesto que la interacción entre AKIN10/SnrRK1.1, AKIN11/SnrRK1.2 y AKIN $\beta 3$ con el almidón está mediada por la subunidad AKIN $\beta\gamma$.

6. El almidón en hojas

El almidón sintetizado durante el día y almacenado en los cloroplastos en forma de gránulos, es degradado casi en su totalidad al final del periodo de oscuridad para mantener el suministro de carbohidratos en el resto de la planta. Los principales productos de degradación del almidón son la maltosa y la glucosa; ambos sacáridos son transportados hacia el citoplasma donde son metabolizados posteriormente (Zeeman et al., 2010).

6.1. Degradación del gránulo de almidón

Al presentar una estructura compacta y compleja, el gránulo de almidón debe perder en la superficie la rigidez característica para ser degradado. Este proceso inicia con la

fosforilación del gránulo para permitir que disminuya la compactación del gránulo (Nashilevitz et al., 2009; Yu et al., 2001). En primera instancia, la enzima GWD (α -glucan water dikinase) fosforila residuos glucosídicos en la posición C6 (Ritte et al., 2002), los análisis estructurales de los glucanos fosforilados, sugieren que la fosforilación en la posición C6 puede interrumpir el empaquetamiento de los gránulos de almidón. La actividad de GWD es indispensable para iniciar el proceso de degradación del almidón, las plantas mutantes *gwd* acumulan almidón en altas concentraciones al finalizar el día mientras que al llegar el amanecer la pérdida de almidón es prácticamente nula. Después una segunda enzima, PWD (Phosphoglucan water dikinase) reconoce la primera fosforilación y actúa sobre el residuo fosforilándolo en la posición C3. En las mutantes de *gwd* que no degradan almidón, no ha sido posible detectar la actividad de PWD, por lo que ahora se sabe que la enzima PWD es dependiente de la fosforilación llevada a cabo por GWD.

Una vez que el gránulo se encuentra relajado, el siguiente paso en la degradación del almidón es la remoción de los grupos fosfato para permitir la actividad de las enzimas hidrolíticas. Esta acción es catalizada por una fosfoglucono fosfatasa (Figura 7). En plantas carentes de esta enzima, las enzimas amilolíticas no pueden actuar sobre el residuo que está fosforilado cerca del extremo no reductor y en consecuencia acumulan almidón, razón por la cual a la enzima fosfatasa se le nombró SEX4 (Starch Excess 4) (Hezaji et al., 2009).

Llevada a cabo la solubilización de las cadenas en la superficie de los gránulos de almidón, empieza la hidrólisis mediada por las enzimas amilolíticas que actúan sobre los enlaces α -1,4 y α -1,6. La hidrólisis de las cadenas lineales se lleva a cabo por las β -amilasas (BAMs), exoamilasas que liberan maltosa a partir de los extremos no reductores de las cadenas. En *A. thaliana* se conocen 9 isoformas de enzimas BAMs, pero sólo 4 de ellas se localizan al interior de los cloroplastos (BAM1, 2, 3, 4). Estas enzimas no tienen la capacidad de hidrolizar enlaces α -1,6 y son incapaces de actuar en enlaces α -1,4 cerca de los puntos de ramificación. Es por eso que la progresiva degradación del almidón ocurre gracias a las enzimas desramificadoras del almidón (DBEs, Starch Debranching Enzyme), la más importante y representativa es la isoamilasa (ISA3) que hidroliza los enlaces α -1,6 liberando glucanos lineales que pueden ser sustrato de BAMs (Figura 7). Las mutantes de *bam3*, *bam4* o *isa3* reducen significativamente la tasa de degradación del almidón aunque no lo abaten completamente, lo que indica que existen otras enzimas involucradas en la

degradación que compensan parcialmente la deficiencia de estas enzimas (Delatte et al., 2006).

Aunque las BAMs y DBEs son las enzimas con mayor importancia en la degradación del almidón, también se ha demostrado la participación de otras enzimas. Se sabe que las endo-amilasas (AMY) tienen una alta actividad durante la germinación de semillas, pero aparentemente en el metabolismo de las hojas su papel es limitado. En *A. thaliana* se conocen tres isoformas AMY1, AMY2 y AMY3, las últimas dos se localizan en los cloroplastos y al hidrolizar enlaces internos, liberan glucanos ramificados que son sustrato de ISA3. Las plantas mutantes *amy1/amy2/amy3*, demostraron que estas enzimas no son los elementos principales para la degradación del almidón pues las rutas catabólicas que se activan en periodos de obscuridad permanecen activas y el fenotipo es similar a las plantas del tipo silvestre.

Los glucanos lineales producto de la actividad de ISA3 y de las α -amilasas tienen diferentes destinos según su longitud. Los maltoligosacáridos (MOS) cuya longitud es mayor a cinco unidades de glucosa, son sustrato de las enzimas BAM. Los MOS con sólo tres unidades de glucosa, que se producen durante la degradación del almidón son demasiado cortos para ser sustrato de las enzimas BAM, así que la maltotriosa (Glc3) es posteriormente metabolizada por DPE1 (Disproportionating Enzyme 1). Las plantas mutantes *dpe1* acumulan grandes cantidades de Glc3 durante la noche (Critchley et al., 2001). La actividad de DPE1 ha sido ampliamente estudiada y actualmente se sabe que su actividad resulta en la liberación de una molécula de glucosa y una de maltopentaosa (Glc5) que es sustrato de BAM.

Otra vía que pueden seguir los glucanos lineales, es la que lleva a cabo la enzima α -glucanofosforilasa (PHS1) que ha mostrado preferencia por maltoligosacáridos de cinco o más glucosas en experimentos *in vitro* (Steup, 1981). La enzima PHS1 libera G1P desde el extremo no reductor del oligosacárido. Las mutantes *phs1* no muestran una disminución en la tasa normal de degradación del almidón sin embargo, son más sensibles al estrés abiótico por lo que se propuso que PHS1 puede suministrar sustratos para la fase oxidativa de las pentosas fosfato durante periodos de estrés (Zeeman et al., 2004).

En resumen, la degradación del almidón se lleva a cabo principalmente por procesos hidrolíticos. El producto mayoritario resultante de la degradación del almidón durante la noche es la maltosa, y en menor medida glucosa y G1P que se exportan para seguir en otras rutas metabólicas (Figura 7).

Las formas predominantes de los productos de degradación del almidón siguen diferentes rutas para ser metabolizadas en la célula. Los modelos propuestos sugieren que mientras la G1P puede ser metabolizada en el interior de los cloroplastos y proveer a los mismos de sustratos para la glucólisis u otras vías, la glucosa por otra parte puede ser exportada hacia el citosol (Zeeman et al., 2004). De manera muy importante, la maltosa además de ser el principal producto de la degradación del almidón, es el azúcar que tiene un mayor flujo de exportación desde los cloroplastos (Weise et al., 2004), evento que ocurre gracias a la participación de transportadores específicos. Existen distintos transportadores tanto de glucosa como de maltosa (MEX1) que facilitan la difusión de estos azúcares entre el estroma de los cloroplastos y el citosol (Cho et al., 2011; Niittylä et al., 2004). Las mutantes *mex1* presentan un fenotipo de acumulación de maltosa y de almidón, con lo que se propuso un mecanismo de inhibición por retroalimentación del proceso de degradación de almidón, es decir, altas concentraciones de maltosa conducen a una acumulación de almidón al interior de los cloroplastos.

El metabolismo citosólico de la maltosa requiere una serie de enzimas que la convierten a hexosas fosfato, moléculas precursoras en la síntesis de sacarosa. En la búsqueda de genes relacionados con enzimas que pueden metabolizar a la maltosa en otros organismos, se reportó en *A. thaliana* a la enzima DPE2 (Disproportionating Enzyme 2), cuya actividad ha sido documentada como una 4- α -glucanotransferasa citosólica (Chia et al., 2004; Lu & Sharkey, 2004). Las plantas mutantes *dpe2* crecen significativamente más lento respecto a las plantas del tipo silvestre, además de acumular hasta 500 veces más maltosa y presentar un fenotipo de exceso de almidón (Chia et al., 2004). Los experimentos *in vitro* realizados con DPE2 concluyeron que existe liberación de glucosa a partir de α -glucanos únicamente en presencia de maltosa y glucógeno (Lloyd et al., 2004), ausente en células vegetales, pero que se emplea en experimentos *in vitro* como molécula receptora de la glucosa.

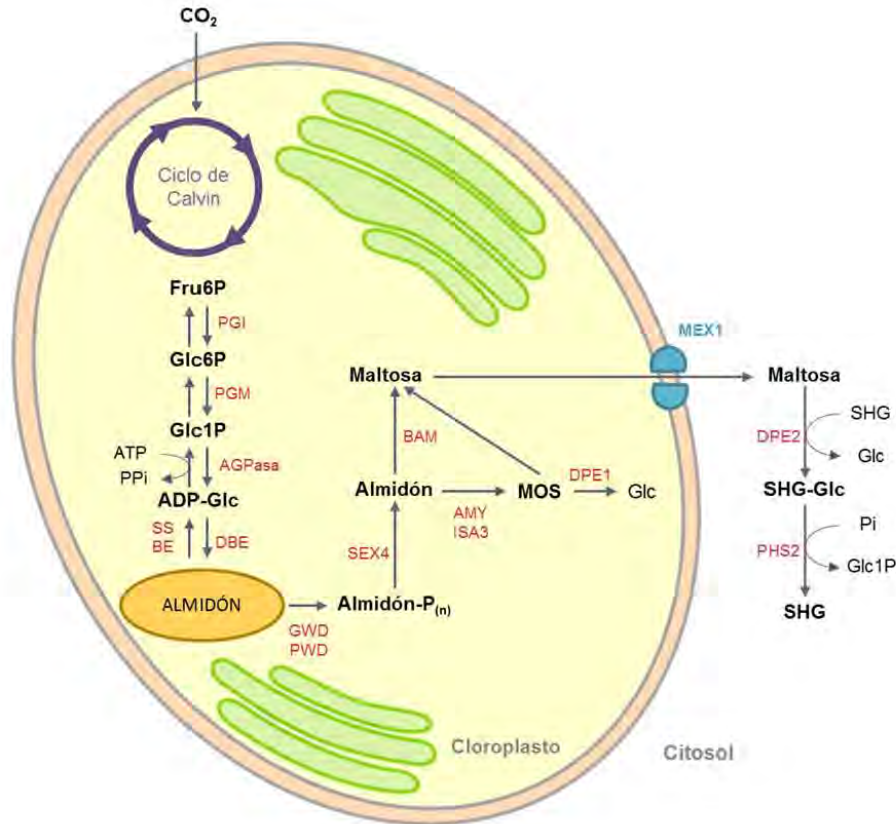


Figura 7. Esquema del metabolismo del almidón en hojas. Durante el día el dióxido de carbono (CO_2) es fijado en el Ciclo de Calvin, del cual se obtienen triosas para la síntesis de sacarosa y almidón. La síntesis de almidón comienza con la fructosa-6-fosfato (Fru6P) que por actividad de la PGI (fosfoglucoisomerasa) se isomeriza a glucosa-6-fosfato (Glc6P), sobre la cual actúa la PGM (fosfoglucomutasa) que transfiere el grupo fosfato del carbono 6 al 1 para generar glucosa-1-fosfato (Glc1P) con la que se produce ADP-Glc con la enzima AGPasa (ADP-glucosa fosforilasa). La ADP-glucosa es utilizada por diferentes tipos de enzimas (Starch Synthesis, SS o Branching Enzymes, BE) para la síntesis del gránulo de almidón. Al iniciar la degradación durante la noche, el gránulo de almidón debe ser fosforilado por GWD (α -glucan water dikinase) y PDW (Phosphoglucan water dikinase) para permitir la solubilización de las cadenas de glucosa. Posteriormente, estos grupos fosfatos son removidos por la enzima SEX4 (Starch Excess 4) para que posteriormente las BAM (β -amilasas) lleven a cabo la reacción de hidrólisis en los extremos no reductores de las cadenas de amilosa. Durante este periodo la producción de maltosa aumenta y se transporta a través de MEX1 (Maltose Excess 1) hacia el citosol donde será metabolizada. Debido a la actividad de AMY (α -amilasas) e ISA3 (enzima desramificadora), se generan MOS (maltoligosacáridos) que pueden ser sustrato de BAM o de DPE1 (Disproportionating Enzyme 1) para producir glucosa (Glc) o maltosa. Por otro lado, la maltosa en el citosol es metabolizada por DPE2 (Disproportionating Enzyme 2) para liberar una molécula de glucosa y la otra transferirla a un SHG (Soluble-Heteroglycan). (Modificado de Streb & Zeeman, 2012).

Las 4- α -glucanotransferasas catalizan la reacción que transfiere un residuo glucosídico de un 1,4- α -D-glucano a una nueva posición en una molécula receptora que puede ser glucosa o cualquier 1,4- α -D-glucano (MacGregor et al., 2001). La DPE2 cataliza la transferencia de una molécula de glucosa proveniente de la maltosa a un heteroglucano soluble (SHG) compuesto por galactosa y arabinosa principalmente aunque también contiene en menor medida fucosa, manosa, ramnosa y xilosa (Fettke et al., 2004; Fettke et al., 2005), mientras que la segunda molécula de glucosa es liberada al citosol.

Además de la DPE2, existen una serie de enzimas amilolíticas y glucanofosforilasas (PHS2) que se encuentran en el citosol. Estas enzimas no acceden al almidón ni a sus productos inmediatos localizados al interior de los cloroplastos así que todas ellas deben usar como sustratos a SHG en el citosol. Se demostró que DPE2 usa como sustrato al mismo SG que PHS2 para transferir un grupo glucosil de la maltosa y que ambas interactúan específicamente con el SG. Estudios posteriores con ^{14}C revelaron que la DPE2 puede transferir el residuo desde la maltosa al SHG y que PHS2 transfiere el mismo residuo del SHG a ortofosfato para producir G1P (Fettke et al., 2006), con lo que se completa la vía de degradación del almidón.

II. ANTECEDENTES INMEDIATOS

Datos obtenidos anteriormente en nuestro grupo de investigación revelaron que el SBD de las subunidades AKIN β 2 y AKIN β γ conserva la topología propia del GDB presente en las subunidades AMPK β de mamíferos y que AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ son capaces de unir almidón *in vitro* (Ávila-Castañeda et al., 2014; Ruiz-Gayosso, datos no publicados). Sin embargo, *in vivo* existe una limitación importante debida a la presencia de cada subunidad en organelos celulares particulares. En las plantas, el mayor reservorio de almidón transitorio son las hojas, donde el polisacárido es sintetizado y almacenado en forma de gránulos al interior de los cloroplastos. Es por esta razón que la funcionalidad *in vivo* de las subunidades SnRK1 β (AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ) está determinada también por su localización subcelular.

La localización subcelular de las subunidades SnRK1 β (Figura 8), determinada por técnicas inmunohistoquímicas, revelaron que AKIN β 1 y AKIN β γ se encuentran tanto afuera como en el interior de los cloroplastos, mientras que AKIN β 2 se localiza principalmente en el citosol, (Ávila-Castañeda et al., 2014; Ruiz-Gayosso no publicado). La presencia en el citosol de las subunidades SnRK1 β que tienen SBD, donde no hay almidón, permite especular sobre la posibilidad de que estas proteínas tuvieran funciones diferentes a la regulación mediada por el almidón, como se había propuesto anteriormente y como sucede en mamíferos. Por ejemplo, que pudieran unirse a carbohidratos presentes en el citosol que estén relacionados con el metabolismo del almidón como la glucosa, G1P o maltosa.

Experimentos preliminares donde se midió la fluorescencia intrínseca de la proteína, sugieren que no existe unión directa entre la sacarosa, la glucosa, la G1P, la G6P, la T6P, carbohidratos que inhiben al complejo, y las subunidades que contienen SBD (AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ), pero sí existe un cambio importante en la fluorescencia al utilizar maltosa. Como se mencionó anteriormente, la maltosa es un disacárido que se forma como producto de la degradación del almidón, por lo que podría existir una conexión entre la presencia de este azúcar y la actividad de SnRK1 para controlar y regular la degradación del polímero de reserva.

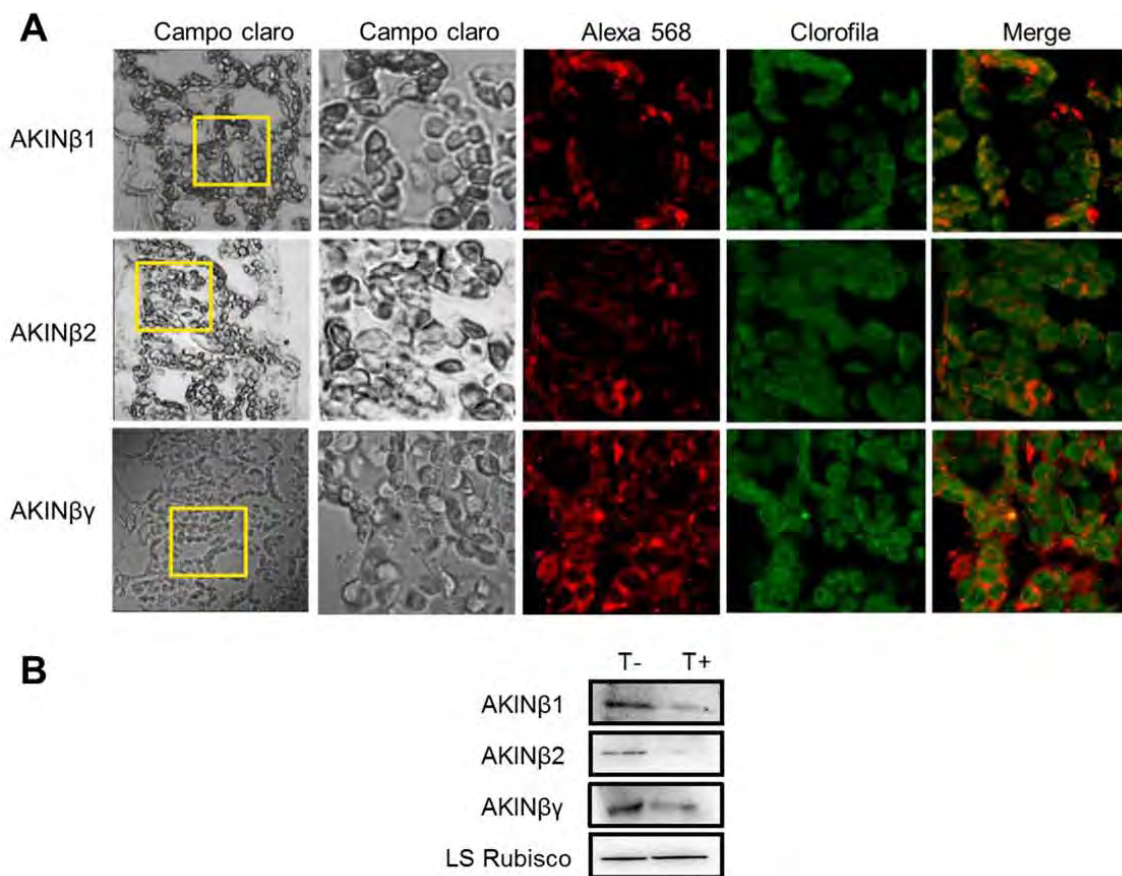


Figura 8. Localización de las subunidades β -SnRK1. (A) La detección de las proteínas AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ en cortes finos de hojas de *A. thaliana* por técnicas inmunohistoquímicas, usando el anticuerpo secundario Alexa 568 (rojo) y la autofluorescencia de la clorofila como marcador de cloroplastos (verde), muestra que existe una fracción de estas subunidades que se encuentra en el citosol. (B) La purificación de cloroplastos de hojas d *A. thaliana* que fueron o no tratados con termolisina (T-, tratamiento sin termolisina; T+, tratamiento con termolisina) para retirar proteínas asociadas a la parte externa de los cloroplastos, corrobora la presencia de estas subunidades en el citosol (Tomado de Ruiz-Gayosso, 2015).

III. HIPÓTESIS

La maltosa se une a las subunidades reguladoras β que contienen dominio de unión a almidón (SBD), modificando la actividad de cinasa del complejo SnRK1.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Caracterizar la unión a la maltosa de las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN $\beta\gamma$ y el efecto que tiene en la actividad de cinasa del complejo SnRK1.

2. Objetivos Particulares

- Obtener las proteínas recombinantes AKIN β 1, AKIN β 2 y el dímero AKIN $\beta\gamma$ - β 3.
- Realizar ensayos de unión a maltosa con las proteínas recombinantes AKIN β 1, AKIN β 2 y el dímero AKIN $\beta\gamma$ - β 3.
- Evaluar la actividad de complejos SnRK1 en presencia de maltosa.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Los experimentos realizados con material vegetal fueron elaborados en su totalidad con plantas de *A. thaliana* variedad Columbia (Col-0).

1.1. Germinación de las semillas y crecimiento de las plantas

Las semillas de *A. thaliana* se germinaron en tierra (Metromix-200), para lo cual se colocaron en la superficie del sustrato y se cubrieron con plástico auto-adherente para evitar la pérdida de humedad. Se colocaron a 4 °C durante 3 días en oscuridad y posteriormente se trasladaron a una cámara de crecimiento en condiciones controladas de día corto (8 h luz/16 h oscuridad) a 22 °C. A la semana de edad, las plántulas se trasplantaron a macetas individuales para continuar su crecimiento en condiciones de fotoperiodo natural durante 3 semanas más. El riego con agua fue alternado y un día a la semana se utilizó la solución nutritiva de Hoagland (KNO₃ 6 mM; Ca(NO₃)₂·4H₂O 4 mM; MgSO₄·7H₂O 2 mM; NH₄H₂PO₄ 1 mM; Fe-EDTA pH 5.2-5.5 0.5% m/v; H₃BO₃ 46 µM; MnCl₂·4H₂O 9 µM; ZnSO₄·7H₂O 0.8 µM; CuSO₄·5H₂O 0.3 µM).

Para los ensayos de actividad de cinasa, las hojas de plantas de 4 semanas de edad fueron recolectadas a las 6 a.m., 12 p.m. y 6 p.m. y congeladas en nitrógeno líquido hasta su tratamiento posterior.

2. Clonación del cDNA de AKINβ1 y AKINβ2 en el vector pET28b(+)

La clonación en un vector de expresión requiere diversos pasos que se explican a continuación, así como las técnicas empleadas para dicho procedimiento.

2.1. Amplificación del cDNA

Para iniciar con la clonación de la secuencia codificante de las subunidades AKINβ1 y AKINβ2 y clonarlo en el vector de expresión pET28b(+), se diseñaron oligonucleótidos específicos cuya secuencia es:

AKINβ1Fwd (NcoI): 5'-CATGCCATGGGAAATGCGAAC-3'

AKIN β 1Rev (*EcoRI*): 5'-CGGAATTCCGTGTGAGCG-3'

AKIN β 2Fwd (*NcoI*): 5'-CATGCCATGGCTATGTCTGCTGC-3'

AKIN β 2Rev (*EcoRI*): 5'-CGGAATTCCGCCTCTGCAGGGAT-3'

Con estos, se amplificó el CDS a partir de clonas obtenidas de TAIR (The Arabidopsis Information Resource). La amplificación se realizó utilizando la enzima One Taq DNA Polymerase (New England Biolabs), siguiendo el programa que se describe a continuación: 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 30 ciclos de tres temperaturas; 30 s a 94 °C, 30s a 60 °C y 1 min a 72 °C y finalmente 1 ciclo de 5 min a 72 °C.

El resultado de la amplificación se cargó en un gel de agarosa 1% m/v para separar las bandas e identificarlas por peso molecular. Las bandas obtenidas se purificaron del gel usando el kit de purificación (Sigma-Aldrich Gen Elute Gel Extraction Kit) siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

2.2. Clonación en el vector de clonación pGEM-T Easy Vector

Para la clonación en el vector pGEM-T Easy Vector se siguieron las instrucciones del fabricante. La ligación se incubó a 4 °C durante una noche y posteriormente, la mezcla se utilizó para transformar células quimiocompentes *Escherichia coli* DH5 α que se sembraron en placas de medio sólido (agar 1.2% m/v) LB (Luria Broth) adicionado con Ampicilina (Amp, 100 μ g/mL), Isopropil- β -D-1-tiogalactósido (IPTG, 0.5 mM) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal, 80 μ g/mL). Las cajas Petri con las células transformadas se incubaron a 37 °C durante toda la noche (Over night, O/N). Al día siguiente, se seleccionaron tres de las colonias blancas obtenidas en las placas para posteriormente purificar plásmido como se describe más adelante. La clonación del inserto de interés se evaluó utilizando la enzima de restricción *EcoRI* (New England Biolabs).

2.3. Clonación en el vector de expresión pET-28b(+)

Una vez que se verificaron las clonas por ensayos de restricción, se digirieron 2 μ g de DNA con las enzimas *NcoI* y *EcoRI* (New England Biolabs) en el Buffer 3.1 de la misma casa comercial. Las digestiones se incubaron O/N a 37 °C y posteriormente se cargaron en un gel de agarosa 1% m/v, donde se identificaron las bandas de interés. El inserto correspondiente al cDNA de las subunidades se cortó del gel de agarosa y se purificó usando el kit Gen Elute Gel Extraction (Sigma Aldrich).

Al mismo tiempo se digirió el vector pET28b(+) con las enzimas *NcoI* y *EcoRI* (New England Biolabs) usando las mismas condiciones, se purificó del gel y se desfosforiló utilizando la enzima CIAP (fosfatasa alcalina) durante 1 h a 37 °C. Para inactivar a la enzima, se agregó EDTA pH 8 10 mM y se calentó a 65 °C durante 15 min. El plásmido linearizado y desfosforilado se utilizó para llevar a cabo la ligación con el inserto deseado durante 4 h a 16 °C. La reacción de ligación se utilizó para transformar células quimiocompetentes *E. coli* DH5α por choque térmico. Estas células se sembraron en placas de medio sólido LB adicionado con Kanamicina (Kan, 50 µg/mL) que fueron incubadas a 37 °C O/N. De las colonias seleccionadas, se tomaron seis para su evaluación por digestión y posterior secuenciación.

3. Preparación de las células quimiocompetentes

Para la preparación de las células competentes se llevó a cabo toda la manipulación en condiciones de esterilidad. Se obtuvieron colonias aisladas de las cepas de *E. coli* DH5α, BL21-RIL y BL21-DE3 en placas de medio sólido LB. Una de las colonias se inoculó en 50 mL de medio líquido LB y se dejó crecer a 37 °C O/N en agitación (250 rpm). Con 5 mL del precultivo, se inocularon 200 mL de medio LB y las células se dejaron crecer a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0.375. El cultivo se colocó en frascos para centrifuga estériles fríos y se incubó en hielo por 10 min para después centrifugar a 4000xg por 7 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el paquete celular se resuspendió cuidadosamente en 20 mL de solución CGP (CaCl₂ 60 mM; glicerol 15% v/v; PIPES 10 mM pH 7.0) estéril y previamente enfriada a 4 °C. Se repitió la centrifugación y la pastilla se resuspendió nuevamente en 20 mL de solución CGP, la suspensión de células se incubó en hielo por 30 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó nuevamente a 4000xg por 7 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y las células de *E. coli* se resuspendieron en 2.5 mL de solución CGP. Se tomaron alícuotas de 50 µL en tubos Eppendorf estériles, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

4. Transformación de células competentes

La transformación de las células competentes se realizó siguiendo la metodología de choque térmico. Para este procedimiento se descongeló una alícuota de 50 µL en hielo

durante 10 min y posteriormente se agregaron 200 ng de DNA plasmídico o producto de ligación, según sea el caso. La mezcla se incubó en hielo por 30 min y se realizó un choque térmico a 42 °C por 30 s. Inmediatamente después, las células se trasladaron a hielo por 2 min, se agregaron 450 µL de medio LB y se incubó a 37 °C por 2 h con agitación. Las bacterias se sembraron en placas de medio sólido LB adicionado con el antibiótico correspondiente.

5. Purificación del plásmido

Para la purificación del plásmido, se inoculó una colonia en 5 mL de medio líquido LB con Kan (50 µg/mL) y se dejó crecer a 37 °C O/N. Posteriormente, el cultivo bacteriano se centrifugó a 12 000xg por 1 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla celular obtenida se resuspendió en 200 µL de solución GTE (Glucosa 50 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8.0; EDTA 10 mM) para después lisar las células con una solución alcalina (NaOH 0.2 M; SDS 1% m/v), que se mezcló cuidadosamente por inversión 4 veces. Después, se agregaron 350 µL de la solución de neutralización (Acetato de sodio, NaCH₃COO·3H₂O, 3 M pH 5.0), que se mezclaron nuevamente por inversión 4 veces.

Con la finalidad de separar los restos celulares, la mezcla se centrifugó a 12 000xg por 10 min a 4 °C para desechar la pastilla y tomar el sobrenadante. A los 200 µL de sobrenadante recuperado, se les agregaron 600 µL de isopropanol frío, se mezcló y se dejó precipitando a -70 °C por 1 h. Pasado ese tiempo, se centrifugó la mezcla a 12 000xg por 7 min a 4 °C, el sobrenadante se desechó y la pastilla se dejó secar por aproximadamente 30 min. Una vez seca, la pastilla se resuspendió en 200 µL de agua (libre de DNAsa), se agregó RNAsa a una concentración final de 0.05 µg/µL y se dejó incubando a 37 °C por 1 h. Posteriormente, para eliminar a las proteínas que están presentes en la mezcla, incluida la RNAsa, se agregaron a cada tubo 200 µL de PCI (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, 25:24:1), se mezcló vigorosamente hasta obtener una emulsión de color blanco opaco y se centrifugó nuevamente a 12 000xg por 4 min a 4 °C. Se tomó la fase acuosa superior (200 µL aproximadamente) y se colocó en un tubo Eppendorf nuevo. Para precipitar el DNA, se agregó 1/3 del volumen de la fase acuosa (66.7 µL) de acetato de amonio 10 M, junto con 2 volúmenes de etanol absoluto (400 µL) y se dejó enfriar a -70 °C por 1 h. Una vez precipitado el DNA, se centrifugó a 12 000xg por 4 min a 4 °C, la pastilla se lavó con 1 mL

de etanol 75% v/v y se centrifugó de nueva cuenta a 12 000xg por 4 min. La pastilla se dejó secar durante 1 h y se resuspendió en 50 μ L de agua grado biología molecular.

Debido a que para la secuenciación es necesario purificar el plásmido con kits comerciales, las colonias bacterianas de interés se inocularon en 5 mL de medio LB con Kan (50 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C O/N. La purificación del plásmido se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Sigma-Aldrich Gen Elute Plasmid Miniprep Kit). El plásmido se mandó a secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

6. Electroforesis en gel de agarosa

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

7. Obtención de la proteína recombinante

La obtención de la proteína recombinante se realizó en dos pasos. El primero de ellos corresponde a la sobreexpresión en células de *E. coli* BL21-RIL o BL21-DE3, y el segundo la purificación de la proteína.

7.1. Sobreexpresión de la proteína recombinante

Para la sobreexpresión de la proteína recombinante, células quimiocompetentes *E. coli* BL21-RIL se transformaron con el plásmido pET28b-AKIN β 1 y pET28b-AKIN β 2 (Kan, 100 μ g/mL), cuya construcción se realizó previamente.

Por otro lado, para la obtención de los dímeros recombinantes AKIN β γ - β 3 y AKIN β γ (Δ SBD)- β 3, células quimiocompetentes *E. coli* BL21-DE3 se cotransformaron con los plásmidos pCDF-AKIN β γ o pCDF-AKIN β γ (Δ SBD) (Estreptomicina, Strp 25 μ g/mL) y pET101-AKIN β 3

(Amp 50 µg/mL). Estos plásmidos se generaron en el grupo de laboratorio en proyectos alternos.

De las colonias obtenidas, se dejaron crecer precultivos O/N a 37 °C en 50 mL medio LB con los antibióticos necesarios. Al día siguiente, se inocularon dos matraces de 2 L con 500 mL de medio LB adicionado con los antibióticos necesarios, usando 5 mL del precultivo y se dejó crecer a 37 °C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 1 para AKINβ1 y AKINβ2 y de 0.7 para los dímeros. Al alcanzar esta DO, los cultivos de AKINβ1 y AKINβ2 se indujeron con 1 mM de IPTG a 18 °C durante 16 h. Mientras que los cultivos de los dímeros AKINβγ-β3 y AKINβγ(ΔSBD)-β3, se indujeron con 0.5 mM de IPTG a 25 °C durante 4 h. Transcurrido el tiempo indicado según las condiciones de sobreexpresión, el cultivo se centrifugó a 5000xg por 20 min. La pastilla se almacenó a -70°C hasta su utilización.

La proteína de unión a maltosa (MBP, Maltose-Binding Protein) se utilizó como control positivo, así que células quimiocompentes *E. coli* BL21-RIL se transformaron con el plásmido vacío pMAL-c5x (Amp, 100 µg/mL). De las colonias obtenidas, se tomó una para inocular 5 mL de medio LB adicionado con Amp (100 µg/mL) y Glc 0.2% m/v, que se dejó crecer a 37 °C O/N en agitación. Al día siguiente, se inocularon 50 mL de medio LB con Amp (100 µg/mL) y Glc 0.2% m/v y el cultivo se dejó crecer a 37°C hasta una DO₆₀₀ de 0.5. La inducción se llevó a cabo con una concentración de IPTG 0.3 mM durante 2 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo de la inducción, el cultivo se centrifugó a 5000xg por 20 min y la pastilla se almacenó a -70 °C hasta su uso.

7.2. Purificación de la proteína recombinante

7.2.1. Purificación de las proteínas empleando la resina Protino Ni-TED

Para la purificación de las proteínas recombinantes se siguieron las instrucciones de la casa comercial Macherey-Nagel para la resina Protino Ni-TED. El botón formado tras la inducción se resuspendió en 10 mL de Solución LEW (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM pH8), posteriormente se agregó lisozima a una concentración final de 1 mg/mL y se incubó durante 30 min en hielo. Transcurrido el tiempo, las células resuspendidas se sonicaron con una potencia de 200 W. Se emplearon 3 pulsos de 10 s, alternando con 10 s en reposo en hielo. Para eliminar el material genético presente en el lisado celular, se agregó RNAsaA (10 µg/mL) y DNAsal (5 µg/mL) y se incubó en hielo durante 15 min. Además se añadieron

los inhibidores de proteasas PMSF y benzamidina, ambos a una concentración final de 1 mM. El lisado se centrifugó a 10000xg durante 30 min a 4 °C.

Se recuperaron aproximadamente 10 mL de sobrenadante, que representa la fracción soluble. Con la finalidad de eliminar restos membranosos u otros que pudieran disminuir la eficiencia de la resina, el sobrenadante se filtró usando un filtro de 0.45 µm (Millipore). Posteriormente, los 10 mL de filtrado se incubaron con 1 mL de la resina Protino Ni-TED (Macherey-Nagel 745200), previamente equilibrada con 10 mL de Solución LEW, en una columna de plástico durante 15min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se permitió que el lisado saliera por gravedad de la columna (fracción no unida a la columna), se realizaron 10 lavados con 1 mL de Solución LEW y finalmente se recolectaron las fracciones de elución de 1 mL cada una con Solución de Elución (300mM NaCl; 50mM NaH₂PO₄ pH 8) con concentraciones crecientes de Imidazol (50, 100, 150, 200 y 250mM).

Las fracciones enriquecidas con la proteína, se dializaron en Buffer de Diálisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; NaCl 50 mM) durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. La proteína se almacenó a -70 °C hasta su uso.

7.2.2. Purificación de la proteína MBP usando la resina Agarosa-amilosa

Durante la purificación de la proteína MBP, se utilizó la resina Agarosa-Amilosa (New England Biolabs) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Para llevar a cabo este procedimiento, se resuspendió el paquete celular en 1.25 mL de solución CB (Column Buffer NaCl 200 mM; Tris-HCl 20 mM pH 7.4; EDTA 1 mM; Azida de sodio 1 mM) y la suspensión se sonicó con una potencia de 200 W durante 3 ciclos de 15 s en sonicación y 15 s en reposo. Después, el lisado celular se centrifugó a 10000xg por 20 min y se colectó el sobrenadante. Al extracto celular se le agregaron 7.5 mL más de solución CB.

Paralelamente a este procedimiento, se equilibró la resina Agarosa-Amilosa (0.5 mL empacados) con 2.5 mL de solución CB. Una vez que la resina se equilibró adecuadamente, se colocaron los 8.75 mL de lisado en la columna y se dejó salir la fracción no unida. Después se lavó la resina con 6 mL de solución CB y se colectaron fracciones para ser analizadas por electroforesis.

Finalmente, la proteína se recuperó con 5 fracciones de 500 μ L de solución de elución (NaCl 200 mM; Tris-HCl 20 mM pH 7.4; Maltosa 10 mM; EDTA 1 mM; Azida de sodio 1 mM). Las fracciones enriquecidas con la proteína, se dializaron en Buffer de Diálisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5; NaCl 50 mM) durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. La proteína se almacenó a -70 °C hasta su uso.

8. Cuantificación de proteína

La proteína total se cuantificó empleando una modificación del método de Bradford (Bradford, 1976) en placas de poliestireno de 96 pozos (Costar). Se realizó una curva patrón usando BSA (Albúmina Sérica Bovina) a la que se ajusta la cantidad de proteína que se desea medir. La curva patrón se leyó en el espectrofotómetro Epoch (BioTek) a 595 nm. Se realizó una gráfica Abs_{595} vs Concentración de BSA, después se realizó una regresión lineal de la cual se obtuvo una ecuación de la forma:

$$Abs = m[BSA] + b$$

Donde m es la pendiente y b es la ordenada al origen, despejando [BSA], y sustituyendo la Absorbancia medida en el espectrofotómetro, se obtuvo la concentración de proteína en cada muestra.

9. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

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

10. Tinción de geles de poliacrilamida

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

11. Detección de proteínas mediante Western Blot

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

Una vez terminada la transferencia, se procedió a bloquear la membrana durante 1 h con solución de bloqueo (leche descremada 5% m/v; NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ pH 7.4 10 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Tween20 0.1% v/v). Posteriormente, se agregaron los correspondientes anticuerpos primarios específicos para cada subunidad en las diluciones establecidas (Anti-AKINβ1 1:60 000; Anti-AKINβ2 1:60 000; Anti-AKINβγ 1:80 000, Anti-AKINβ3 1:50 000); las membranas se dejaron incubar durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Después de la incubación, la membrana se lavó 3 veces con 10 mL de PBS-Tween20 (NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ pH 7.4 10 mM, KCl 2.7 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Tween20 0.1% v/v) durante 10 min en agitación. Tras los lavados, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (GE Healthcare) la cual se realizó con un título 1:50 000 en PBS-Tween durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Se repitieron los lavados y se reveló la membrana por quimioluminiscencia (Merck Millipore Immobilon Western) en un fotodocumentador Chemidoc (BioRad).

12. Ensayos de unión a maltosa

Para evaluar la capacidad de las subunidades AKINβ1, AKINβ2 y AKINβγ para unirse a la maltosa, se utilizaron técnicas cualitativas y cuantitativas que se describen a continuación.

12.1. Geles de retardo

Como una manera de evaluar cualitativamente la unión de las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ con la maltosa, se realizaron geles de retardo que contienen en la matriz de poliacrilamida al carbohidrato de interés (Tomme et al., 2000). En este caso en particular, se realizaron geles nativos de poliacrilamida (12% m/v) a los que se les añadieron maltosa (Sigma Aldrich) a una concentración final de 0.4 M y amilopectina (Sigma Aldrich) 0.5% m/v y en el caso de los controles, únicamente se agregó alguno de los carbohidratos. Las muestras de proteínas se incubaron a 37 °C durante 15 min con buffer de carga nativo (Tris-HCl 125 mM pH 6.0, glicerol 20% v/v, azul de bromofenol 0.05% m/v). La electroforesis se corrió a un voltaje de 150 V usando buffer de corrida nativo (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM) durante 2 h en un baño de hielo. Para registrar la distancia recorrida por las proteínas, la electroforesis se llevó a cabo hasta que el frente de corrida tocó el límite inferior del gel. Los geles de poliacrilamida se tiñieron empleando azul de Coomassie coloidal.

12.2. Ensayos de unión a maltosa

Para realizar los ensayos de unión a maltosa aprovechando la fluorescencia intrínseca de las proteínas, se prepararon 550 μ L de las soluciones de cada una de las muestras hasta una concentración final de 0.32 μ M y 3 μ M en Buffer de Unión (50 mM Tris pH 7.5; 50 mM NaCl).

Se tomaron 500 μ L que se colocaron en una celda de cuarzo cuadrada de 5 mm para fluorómetro (Starra Cells, Inc). Las lecturas se realizaron usando el espectrofluorómetro OLIS MD45, donde las muestras se excitaron a una longitud de onda de 280 nm y se recolectaron los valores de emisión de la fluorescencia a una longitud de onda desde los 300 a los 400 nm. Inicialmente se registró el espectro emitido por cada proteína en ausencia de ligando. Posteriormente, se agregó 1 μ L de maltosa (1 mM) para llegar a una concentración final de 2 μ M, se incubó por 2 min a 25 °C y se realizaron las lecturas. Para obtener los demás espectros de fluorescencia, se agregó 1 μ L de la solución para aumentar en 2 unidades la concentración final hasta llegar a 30 μ M. El procedimiento se repitió agregando 1.25 μ L de maltosa (2 mM) para aumentar en 5 unidades la concentración hasta alcanzar el valor final de 50 μ M.

Para realizar los cálculos se consideró a la fluorescencia emitida por la proteína a 330 nm como la fluorescencia inicial (F_0). A esa misma longitud de onda, se consideraron los valores de fluorescencia en presencia del ligando, que se considera la fluorescencia final (F_i) en cada una de las concentraciones de maltosa. Con ambos datos, se obtuvo el cambio en la fluorescencia debida a la presencia de la maltosa (ΔF), que es la diferencia entre uno y otro valor ($F_0 - F_i$). El valor absoluto de este cambio representa en realidad una fracción de la F_0 , donde F_0 equivale al 100% y que se denomina fluorescencia relativa (Figura 15) que está en función de la concentración de maltosa (Miller et al., 1983; Telmer & Shilton, 2003; Walker et al., 2010).

13. Actividad de SnRK1

Se recolectaron 50 mg de hojas de plantas de *A. thaliana* a diferentes horas del día y se mantuvieron congeladas a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización. Para extraer las proteínas solubles, las muestras se maceraron en nitrógeno líquido hasta formar un polvo fino. Después se agregaron 200 μL de Buffer de Extracción de SnRKs (Tricina 50 mM pH 8.0, NaF 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, DTT 1 mM, Brij 35 0.02% m/v, glicerol 10% v/v, PVPP 2% m/v, Benzamidina 1 mM y PMSF 1 mM) y se centrifugó a 14000xg durante 10 min para eliminar los restos insolubles. Se colectó el sobrenadante que se desaló haciendo pasar los 200 μL de extracto por 1 mL de Sephadex-25, previamente equilibrada, para lo cual se hizo pasar 1 mL de Buffer de Extracción de SnRKs por la columna, centrifugando a 2000xg durante 2 min. Este paso se repitió 2 veces más.

El extracto desalado se recuperó y se dividió en dos fracciones de 100 μL cada una. Una de ellas se incubó con 2 μL de maltosa 50 mM (concentración final 1 mM) durante 30 min en hielo y a la otra se le agregaron 2 μL de agua desionizada. Transcurrida la incubación, se procedió a medir la actividad de SnRK1 sobre el péptido AMARA, una secuencia de origen sintético que contiene el sitio consenso de fosforilación para el complejo SnRK1. En el ensayo de actividad, la concentración final de maltosa es de 200 μM .

Para realizar el ensayo, se preparó la mezcla de reacción para actividad de cinasa (HEPES-NaOH 50 mM pH 8.0; DTT 5 mM; PPI (Protein Phosphatase Inhibitor) 0.0625x; PIC (Protease Inhibitor Cocktail 1.25x; MgCl_2 6.25 mM; ATP 0.25 mM; AMARA 0.25 mM) con 1.25 MBq de actividad de $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ por cada reacción. En cada medición, se colocaron

20 μ L de la mezcla en una placa con pozos de 200 μ L en un baño de agua 30 °C. Una vez distribuida toda la mezcla, se agregaron 5 μ L de extracto desalado y se incubó durante 6 min. Transcurrido el tiempo, se tomaron 15 μ L que se colocaron en cuadros de fosfocelulosa de 2x2 cm. Los papeles de fosfocelulosa se colocaron en una solución de ácido fosfórico (1% v/v) en agitación constante durante 15 min. Se realizó un segundo lavado en la solución de ácido fosfórico durante 15 min, después se retiró el ácido fosfórico y se reemplazó por acetona, donde los papeles de fosfocelulosa se lavaron durante 15 min más. Para permitir que se secan, los trozos de papel se retiraron de la acetona y se colocaron sobre toallas de papel durante 1 h para asegurar la evaporación completa del solvente (Ávila-Castañeda et al., 2014).

Una vez completamente secos, los papeles se colocaron en viales con 2 mL de líquido de centelleo. El conteo de la actividad se realizó en un contador de centelleo Beckman Coulter LS-6500.

VI. RESULTADOS

1. Clonación en el vector pET28b(+)

Para realizar la clonación de la secuencia codificante de las subunidades AKIN β 1 y AKIN β 2 en el vector pET28b(+), primero se amplificó con cebadores diseñados específicamente para cada secuencia y usando como DNA molde la clona del TAIR. En la Figura 9 se observa la banda que corresponde al peso de AKIN β 1 (852bp) y AKIN β 2 (786bp) que fue amplificada con la enzima *One Taq DNA Polymerase*.

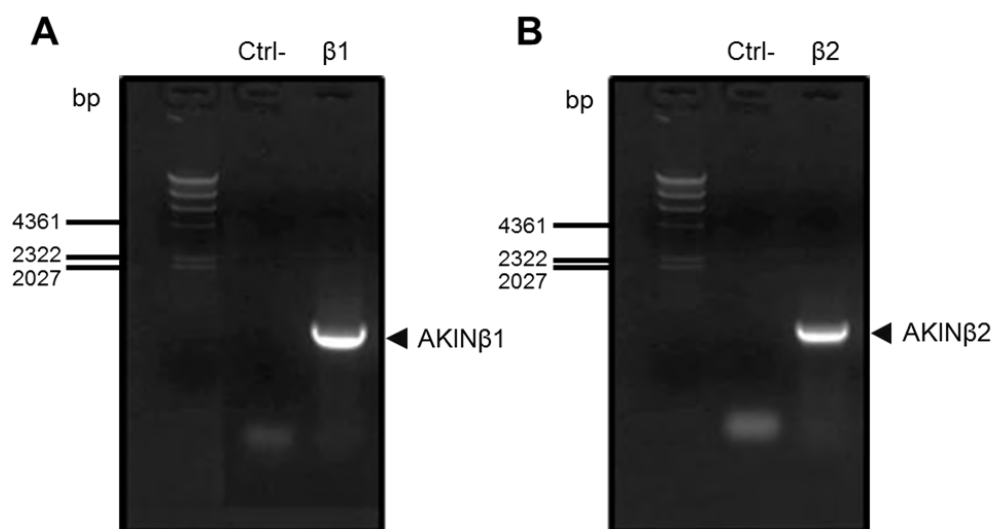


Figura 9. Amplificación del cDNA de las subunidades β -SnRK1. La amplificación de la secuencia codificante se realizó utilizando cebadores específicos para AKIN β 1 y AKIN β 2, respectivamente. En ambos casos se utilizó un control negativo (Ctrl-) sin DNA molde para darle validez a la reacción. Las bandas obtenidas se encuentran por debajo del marcador de 2027bp. La longitud esperada de AKIN β 1 (A) es de 852 bp y de AKIN β 2 (B) es de 786bp.

La banda se cortó y purificó del gel para después ser clonada en el vector pGEM-T Easy. De las clonas obtenidas, se seleccionaron 3 de ellas que fueron evaluadas por digestión con la enzima de restricción *EcoRI* para verificar la liberación del inserto. Para la clonación, el plásmido se digirió primero con *NcoI* durante 2 h a 37 °C y después con *EcoRI* por otras 2 h a 37 °C. Al digerir únicamente con una enzima de restricción fue posible linearizar el plásmido y verificar su tamaño en una electroforesis en gel de agarosa. Mientras que al digerir con ambas enzimas, se permitió la liberación del inserto correspondiente al tamaño

de cada una de las secuencias clonadas. Esta banda se cortó del gel y se purificó. El inserto puro se utilizó para llevar a cabo una ligación con el vector pET28b(+), previamente digerido y desfosforilado, utilizando la ligasa T4. Con la mezcla se transformaron células competentes que se sembraron en medio LB con Kan. Tres de las clonas obtenidas se evaluaron con las enzimas de restricción *NcoI* y *EcoRI*, tanto de manera individual para poder observar la linearización del plásmido en un tamaño aproximado de 6000 bp así como en conjunto (N/E) para poder visualizar la liberación del inserto, donde se observan dos bandas, una de aproximadamente 5000 bp que corresponde al plásmido pET28b(+) y las bandas del tamaño esperado para AKIN β 1 y AKIN β 2 (Figura 10).

De las clonas positivas en el ensayo con enzimas de restricción, se seleccionó una de ellas que se mandó a secuenciar. Los resultados corroboraron la identidad de las secuencias clonadas (Anexo 1). Por otra parte, las construcciones pCDF-AKIN β γ , pCDF-AKIN β γ (Δ SBD) y pET101-AKIN β 3, se generaron en proyectos alternos a este por otros miembros del grupo de laboratorio (Maya-Bernal et al., 2017).

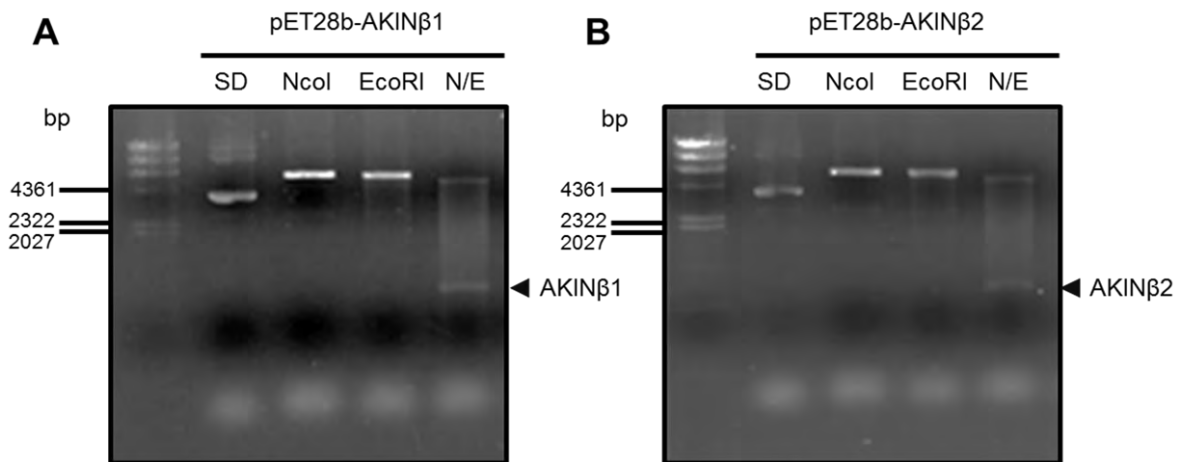


Figura 10. Verificación de las clonas pET28b-AKIN β 1 y pET28b-AKIN β 2 por digestión con enzimas de restricción. La evaluación de las clonas de pET28b-AKIN β 11 (A) y pET28b-AKIN β 2 (B) se realizó utilizando a las enzimas de restricción *NcoI* y *EcoRI*. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, seguido por el plásmido sin digerir (SD) donde se pueden apreciar los diferentes topoisómeros. Los siguientes carriles corresponden a las digestiones con las enzimas señaladas y la doble digestión (N/E) donde se puede ver la liberación del inserto

2. Obtención de las proteínas recombinantes

Los pasos para la obtención de las proteínas recombinantes empleadas en los experimentos de unión se describen a continuación.

2.1. Sobreexpresión de las subunidades AKIN β 1 y AKIN β 2

Las proteínas recombinantes AKIN β 1 y AKIN β 2 se expresaron en células *E. coli* BL21 (RIL). Para lo cual, se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (RIL) con los plásmidos pET28b-AKIN β 1 o pET28b-AKIN β 2. Para lograr una mayor producción de la proteína, se probaron diferentes condiciones, de entre las cuales se seleccionó una temperatura de inducción de 18 °C y una concentración de IPTG 1 mM. La inducción se mantuvo por un periodo de 16-18 h debido a que a esta temperatura, la tasa del metabolismo celular baja considerablemente. Los extractos solubles obtenidos de estos cultivos se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), que se muestran en la Figura 11, en la cual no se puede observar con claridad la sobreexpresión de las proteínas recombinantes AKIN β 1 y AKIN β 2, en el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie (Figura 11) debido a que no se observan bandas de intensidad importante en ninguna de las fracciones en comparación con el control. Sin embargo, la inmunodetección con los anticuerpos específicos indica que el cultivo transformado e inducido genera una cantidad considerable de la proteína recombinante tanto en la Fracción Insoluble (FI) como en la Fracción Soluble (FS) (Figura 11). Al inducir a 18°C, la acumulación de las subunidades AKIN β 1 y AKIN β 2 en la FS se favorece (Figura 11.A). Cabe resaltar que ninguna de las proteínas endógenas de la cepa *E. coli* BL21-RIL sin inducir (Control) es reconocida por los anticuerpos anti-AKIN β 1 y anti-AKIN β 2 en los pesos esperados (Figura 11.A).

La comparación de las subunidades de SnRK1 que tienen un SBD es muy importante, así que inicialmente se propuso la obtención de la proteína recombinante AKIN β γ , sin embargo, la sobreexpresión de esta subunidad siempre tuvo como resultado la acumulación de AKIN β γ en la FI. Por otra parte, en la sobreexpresión de la subunidad AKIN β 3, que carece de manera natural del SBD y que funciona como un control negativo, la mayor parte de la proteína se acumula en la FS, incluso cuando las temperaturas de inducción no favorecen la sobreexpresión de otras proteínas.

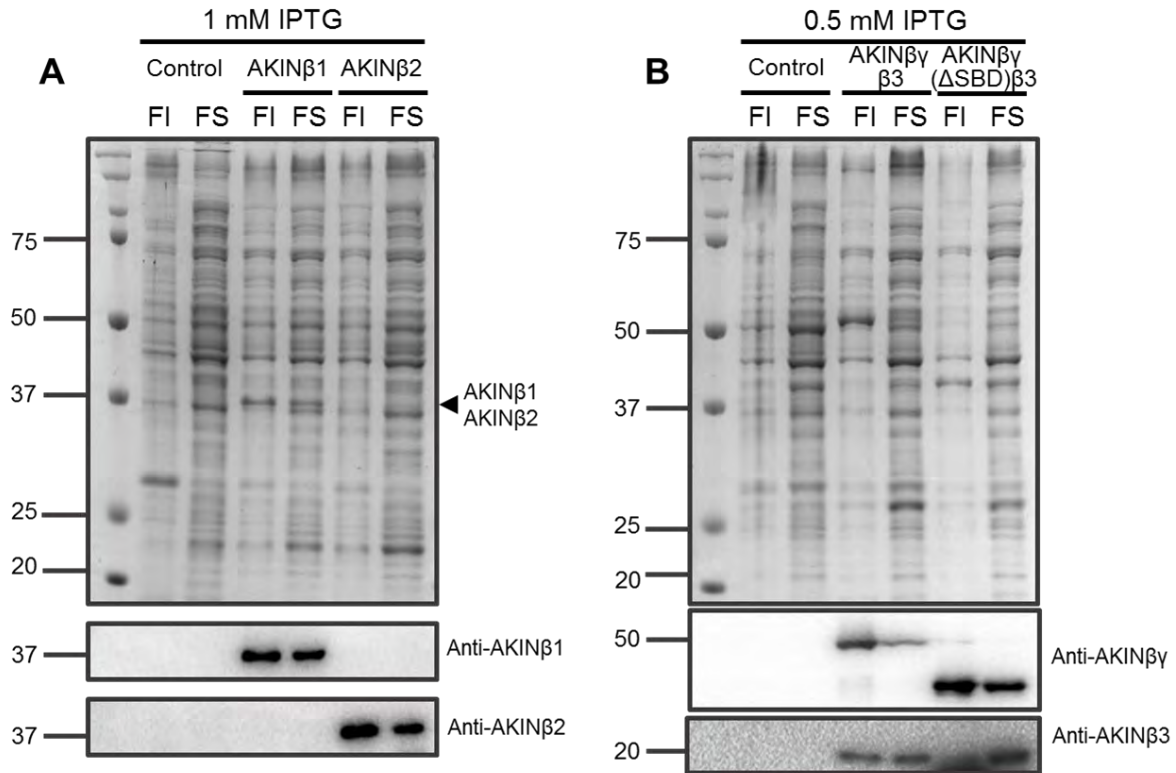


Figura 11. Sobreexpresión de las subunidades β -SnRK1. Análisis de la acumulación de las proteínas recombinantes en la fracción insoluble (FI) y en la fracción soluble (FS) de cultivos bacterianos. La detección de las proteínas AKIN β 1 y AKIN β 2 (A) se realizó utilizando los anticuerpos específicos para cada subunidad, con los que se detectaron bandas en el tamaño esperado (AKIN β 1, 37 kDa; AKIN β 2, 36 kDa; AKIN β γ 53 kDa; AKIN β γ (Δ SBD), 37kDa; AKIN β 3, 15 kDa). En el caso de los dímeros, se utilizaron los anticuerpos para las subunidades AKIN β γ , y AKIN β 3, que conforman los dímeros (B).

La secuencia codificante de esta subunidad se clonó el vector pET101 que permite agregar una etiqueta de 6 histidinas (6xHis), con la cual sería posible purificarla con una columna de afinidad. Sin embargo, durante la purificación no se logró recuperar en ninguna elución un porcentaje importante de AKIN β 3. Al analizar mediante la detección con el anticuerpo Anti-6xHis la presencia de la etiqueta se demostró que la proteína AKIN β 3 contiene esta secuencia (Anexo 2), sin embargo no es posible su interacción con la resina de afinidad, probablemente la secuencia 6xHis no se encuentra expuesta debido a las características estructurales propias de AKIN β 3. En ambos casos no fue posible purificar a las proteínas AKIN β γ y AKIN β 3 de manera monomérica, por lo que fue necesario abordar otras estrategias. De manera paralela a este trabajo, se produjeron dímeros recombinantes formados por las subunidades reguladoras AKIN β γ - β 3 y una versión mutante de AKIN β γ

que carece del SBD con AKIN β 3, AKIN $\beta\gamma(\Delta$ SBD)- β 3 (Maya-Bernal et al., 2017), donde la subunidad AKIN β 3 porta la etiqueta 6xHis. Los dímeros recombinantes AKIN $\beta\gamma$ - β 3 y AKIN $\beta\gamma(\Delta$ SBD)- β 3 se expresaron en células de *E. coli* BL21-DE3 a 25 °C por 4 h con una concentración de IPTG de 0.5 mM. El análisis de la sobreexpresión de los dímeros se realizó en gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie (Figura 11.B), donde no se pudieron identificar claramente las bandas correspondientes a estas proteínas pero cuya presencia se hace notable en la inmunodetección con anticuerpos específicos para ambas subunidades. En la Figura 11.B se muestra el Western Blot utilizando los anticuerpos específicos donde se detectó la presencia de los dímeros AKIN $\beta\gamma$ - β 3 y AKIN $\beta\gamma(\Delta$ SBD)- β 3 en la FS aunque la mayor proporción permanece en la FI.

2.2. Purificación de la proteína recombinante AKIN β 2

Los vectores pET28b(+) y pET101 permiten agregar una etiqueta 6xHis cuya presencia fue corroborada por secuenciación (Anexo 1). Dicha etiqueta facilita la purificación de la proteína a través de una columna de afinidad donde se encuentran fijos iones de Níquel (Ni). Las histidinas se coordinan con los iones de Ni, permitiendo la purificación de las proteínas marcadas con esta etiqueta. Aprovechando esta característica, se purificaron las proteínas recombinantes AKIN β 1 y AKIN β 2 en la resina Protino Ni-TED. De la misma manera, se purificaron los dímeros AKIN $\beta\gamma$ - β 3 y AKIN $\beta\gamma(\Delta$ SBD)- β 3 a pesar de que en forma monomérica no se pudieron obtener estas subunidades. Las eluciones se realizaron con concentraciones crecientes de imidazol (E_{50} , E_{100} , E_{150} , E_{200} , E_{250}), que compite por el Ni, permitiendo la recuperación de las proteínas de interés.

El análisis de las fracciones de purificación mediante SDS-PAGE (Figura 12), muestra que el enriquecimiento de la proteína se logra sólo en algunas fracciones, principalmente en la segunda elución con 50 mM de imidazol (E_{50-2}) y la primera con 100 mM (E_{100-1}). En el caso de las subunidades AKIN β 1 (Figura 12.A) y AKIN β 2 (Figura 12.B), es claro que la banda correspondiente a estas subunidades, reconocida por el anticuerpo específico para cada una de ellas, se encuentra en mayor proporción que otras bandas que pudieran estar presentes. Estas fracciones se dializaron y utilizaron para los ensayos posteriores.

Por otra parte, la purificación de los dímeros se llevó a cabo a través de las subunidades AKIN β 3, que tienen en el C-terminal una etiqueta 6xHis. La clonación de pCDF-AKIN $\beta\gamma$ y pCDF-AKIN $\beta\gamma(\Delta$ SBD) se realizó incluyendo en la secuencia el codón de paro, así que estas

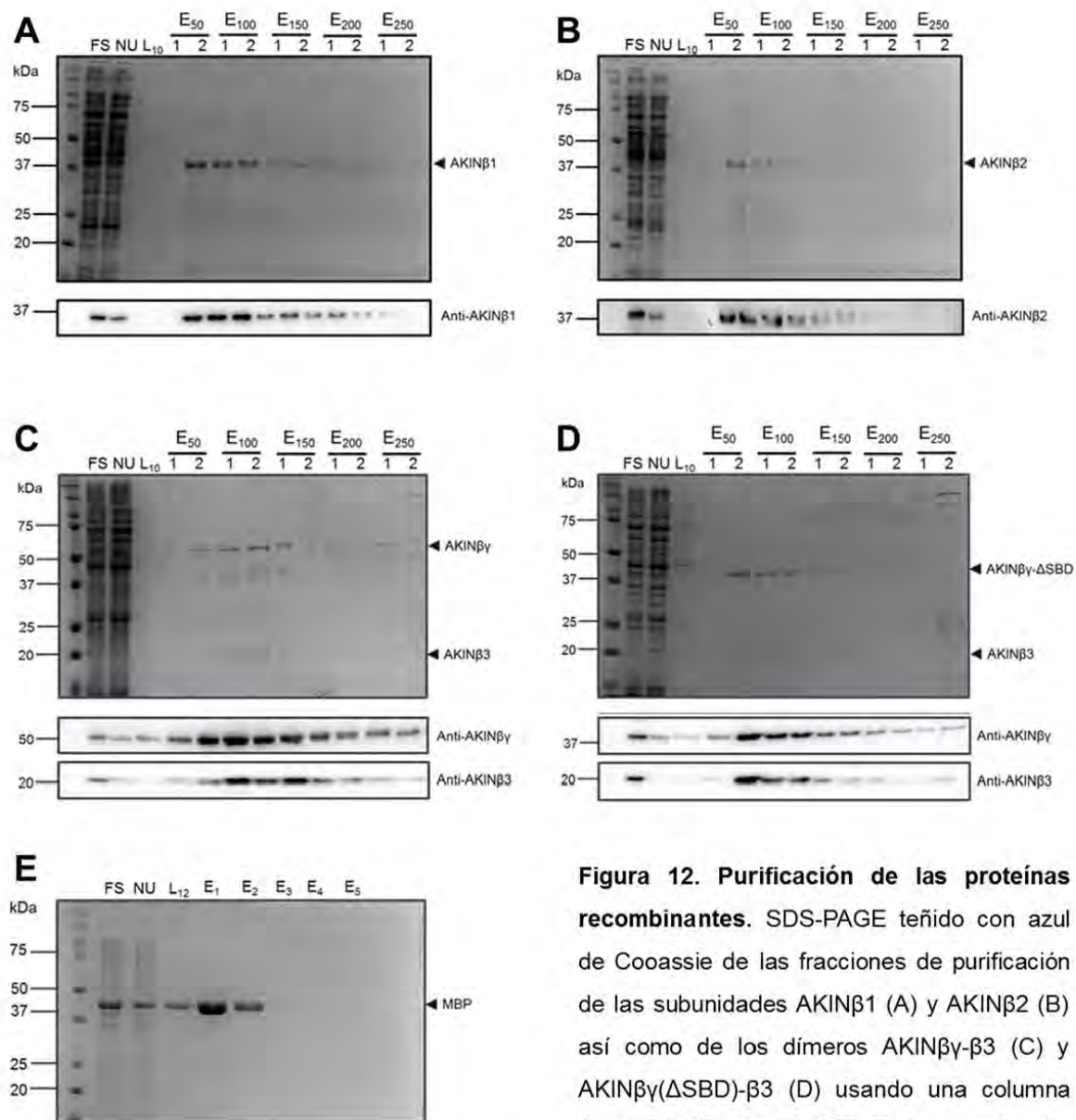


Figura 12. Purificación de las proteínas recombinantes. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las fracciones de purificación de las subunidades AKINβ1 (A) y AKINβ2 (B) así como de los dímeros AKINβγ-β3 (C) y AKINβγ(ΔSBD)-β3 (D) usando una columna de afinidad Protino Ni-TED. En los paneles de la parte inferior de cada imagen se muestra la detección con anticuerpos específicos para cada proteína. Se señala con flechas las bandas correspondientes a cada proteína que se purificó, las cuales migran de acuerdo con la masa molecular estimada para cada subunidad (AKINβ1, 37 kDa; AKINβ2, 36 kDa; AKINβγ, 55 kDa, AKINβγ(ΔSBD), 37 kDa; AKINβ3, 15 kDa y MBP, 42 kDa). La proteína MBP (E), se purificó utilizando una columna de afinidad agarosa-amilosa. En los carriles de los geles se cargó la FS (Fracción Soluble), Fracción No Unida (NU), el último lavado (L₁₀) y las eluciones con concentraciones crecientes de imidazol (E₅₀, E₁₀₀, E₁₅₀, E₂₀₀ y E₂₅₀), de las cuales se llevaron a cabo dos con cada concentración (1 y 2). En la purificación de MBP, el último lavado (L₁₂) y las cinco eluciones (E₁, E₂, E₃, E₄ y E₅).

la parte inferior de cada imagen se muestra la detección con anticuerpos específicos para cada proteína. Se señala con flechas las bandas correspondientes a cada proteína que se purificó, las cuales migran de acuerdo con la masa molecular estimada para cada subunidad (AKINβ1, 37 kDa; AKINβ2, 36 kDa; AKINβγ, 55 kDa, AKINβγ(ΔSBD), 37 kDa; AKINβ3, 15 kDa y MBP, 42 kDa). La proteína MBP (E), se purificó utilizando una columna de afinidad agarosa-amilosa. En los carriles de los geles se cargó la FS (Fracción Soluble), Fracción No Unida (NU), el último lavado (L₁₀) y las eluciones con concentraciones crecientes de imidazol (E₅₀, E₁₀₀, E₁₅₀, E₂₀₀ y E₂₅₀), de las cuales se llevaron a cabo dos con cada concentración (1 y 2). En la purificación de MBP, el último lavado (L₁₂) y las cinco eluciones (E₁, E₂, E₃, E₄ y E₅).

proteínas no contienen la etiqueta 6xHis. De esta manera, es posible purificar sólo aquellas proteínas AKIN β γ o AKIN β γ (Δ SBD) que se encuentren formando dímeros con AKIN β 3, que permite la unión de la proteína con la resina. En estas purificaciones (Figura 12.C y 12.D) es posible observar que a partir de la segunda elución con 50 mM de imidazol (E_{50-2}), se enriquece la presencia del dímero. Sin embargo, no todas las fracciones se consideraron para los siguientes experimentos. Solamente aquellas donde la presencia de los dímeros fue más evidente (desde E_{50-2} hasta E_{150-1}), se dializaron y emplearon para los experimentos posteriores.

La MBP (Figura 12.E), que se utilizó como control positivo en los experimentos de unión a maltosa, se purificó utilizando una resina agarosa-amilosa y las eluciones se llevaron a cabo con maltosa (10 mM). En la primera elución (E_1) se aprecia una banda que corresponde a la MBP purificada. Cabe resaltar que no se observa ninguna otra proteína proveniente de *E. coli* en las eluciones en el gel teñido con azul de Coomassie.

3. Ensayos de unión a maltosa

La capacidad de las proteínas AKIN β 1, AKIN β 2, AKIN β γ - β 3, AKIN β γ (Δ SBD)- β 3 y MBP para unir maltosa se evaluó mediante técnicas cualitativas como cuantitativas que se describen a continuación.

3.1. Geles de retardo

Para evaluar la capacidad de las subunidades AKIN β 1 y AKIN β 2 para unirse a la maltosa, se realizaron geles de retardo que tienen inmerso en la matriz de poliacrilamida un carbohidrato soluble de interés (Tomme et al., 2000). La electroforesis se llevó a cabo en condiciones nativas durante 2 h en un baño de hielo, al finalizar el gel se tiñó con azul de Coomassie (Figura 13). Según los autores de esta técnica, es difícil apreciar si una proteína se une a un mono o disacárido debido a que la masa molecular de este, no generará un cambio visible en la migración de la proteína. Sin embargo, si es posible determinar mediante un ensayo de competencia entre un polisacárido y el mono o disacárido si la proteína en cuestión se une a las moléculas de menor tamaño. Para eso, es necesario que la proteína de interés tenga afinidad por un polisacárido soluble. En experimentos anteriores se determinó que las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ (Ávila-Castañeda et al., 2014; Ruiz-Gayosso, 2015), pueden unirse a gránulos de almidón. Este polisacárido es insoluble

debido al alto grado de compactación que presenta su estructura, formada por amilosa y amilopectina. Sin embargo, la amilopectina aislada es soluble y puede emplearse en este tipo de ensayos. Por lo tanto, se prepararon geles de poliacrilamida (Figura 13) sin ninguno de los carbohidratos, únicamente con amilopectina (0.5% m/v), sólo con maltosa (0.4 M) y un gel en el que se incluyeron a ambos carbohidratos.

En estos geles (Figura 13), puede apreciarse que en los carriles correspondientes al control positivo, MBP (rojo), se observan varias bandas que son un reflejo de las diferentes conformaciones en las que está presente la MBP. En el gel nativo, se pueden apreciar claramente dos bandas principales de MBP, mientras que en presencia de amilopectina estas dos bandas se retrasan, sugiriendo que la MBP puede unirse a la amilopectina. Cuando hay maltosa, se observan 4 bandas, dos de las cuales migran la misma distancia que las bandas en el gel nativo sin carbohidratos. En el gel preparado con maltosa y amilopectina, se pueden observar las mismas bandas que están presentes en el gel con maltosa, lo que sugiere que la afinidad de la MBP por la maltosa es muy alta y la amilopectina no es un buen competidor.

En el caso de las subunidades AKIN β 1 (azul) y AKIN β 2 (amarillo), únicamente se observan dos bandas cerca del frente de corrida en un gel de poliacrilamida en condiciones nativas. Como era de esperarse en presencia de amilopectina, las bandas se retrasan debido a la interacción. Sin embargo, en presencia de maltosa, el retraso en la migración se vuelve más evidente, lo cual sugiere que AKIN β 1 y AKIN β 2 pueden unir maltosa. Finalmente, en presencia tanto de amilopectina como de maltosa, las proteínas AKIN β 1 y AKIN β 2 migran la misma distancia que en el gel que únicamente contiene maltosa.

El comportamiento del dímero AKIN β γ - β 3 (verde) es interesante porque se sabe que en forma monomérica, la subunidad AKIN β γ puede unirse a gránulos de almidón en experimentos *in vitro* y que se encuentra asociada al almidón de manera natural (Gallegos-Pacheco, 2016; Ruiz-Gayosso, datos no publicados). Sin embargo, en el gel que se preparó con amilopectina no se observa un retraso aparente. Este fenómeno puede deberse a que en complejo con AKIN β 3, la subunidad AKIN β γ pierda afinidad por la amilopectina, o bien que no sea la amilopectina la molécula a la cual se une la subunidad AKIN β γ sino a la amilosa, presente también en los gránulos de almidón. Por otro lado, en presencia de maltosa y en el gel que se preparó con ambos carbohidratos, se observa un retraso en al

menos una de las bandas. Se ha observado que el dímero AKIN $\beta\gamma$ - β 3 puede disociarse conforme pasa el tiempo, por lo que es probable que en la muestra estén presentes las subunidades AKIN $\beta\gamma$ y AKIN β 3 de forma monomérica, así como el dímero AKIN $\beta\gamma$ - β 3. De este resultado, resalta que el patrón de bandas en los carriles correspondientes al dímero AKIN $\beta\gamma$ - β 3 en presencia de maltosa cambia respecto a los geles donde el disacárido no está presente. Esto último sugiere que el dímero AKIN $\beta\gamma$ - β 3 es capaz de interactuar con la maltosa. Como controles negativo se utilizaron tanto a la subunidad AKIN β 3 (rosa) como al dímero AKIN $\beta\gamma$ (Δ SBD)- β 3 (anaranjado), que carecen del SBD presente en las otras subunidades. Estas proteínas no cambian su migración en presencia de ninguno de los carbohidratos, lo que indica que no pueden interactuar con la amilopectina ni con la maltosa debido a la delección del SBD.

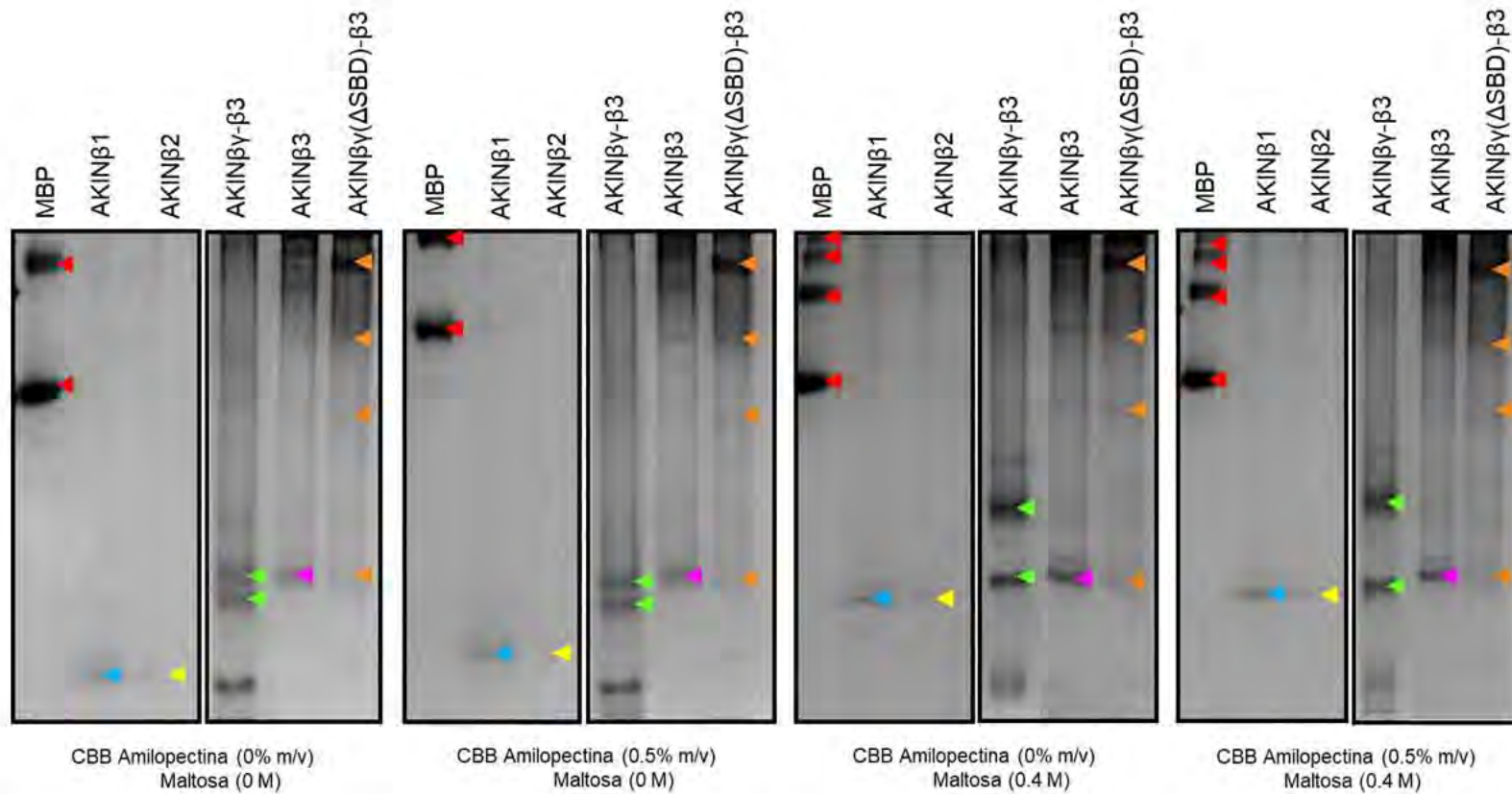


Figura 13. Electroforesis de afinidad. Para evaluar la capacidad de las subunidades AKIN β 1 y AKIN β 2 así como de los dímeros AKIN β γ - β 3 para unir maltosa, se empleó una electroforesis de afinidad, donde se muestra el retraso en la migración que tiene lugar en las proteínas que pueden unir un ligando, en este caso en particular maltosa. Las flechas señalan las bandas principales que se observan con cada muestra, MBP (rojo), AKIN β 1 (azul), AKIN β 2 (amarillo), AKIN β γ - β 3 (verde) AKIN β 3 (rosa) y AKIN β γ (Δ SBD)- β 3 (anaranjado). En la parte inferior, se define la concentración de cada carbohidrato en la matriz del gel de poliacrilamida.

3.2. Ensayos de fluorescencia intrínseca

Midiendo la fluorescencia que emiten las proteínas al ser excitadas a 280 nm, se calcularon las constantes de disociación (K_d) tanto para las subunidades AKIN β 1 y AKIN β 2, así como para los dímeros AKIN β γ - β 3 y AKIN β γ (Δ SBD)- β 3. Los cambios en el espectro de fluorescencia de una proteína en presencia de algún ligando, sugieren modificaciones a nivel de la estructura terciaria que exponen o esconden a los aminoácidos aromáticos, que emiten la fluorescencia de manera diferente respecto a cuando el ligando se encuentra ausente.

En la Figura 14 se observan los espectros representativos de las subunidades AKIN β 1 (A) y AKIN β 2 (B), así como los de los dímeros AKIN β γ - β 3 (C) y AKIN β γ (Δ SBD)- β 3 (E) en presencia de 30 μ M de maltosa. En todos los casos de las proteínas con SBD, se observa el espectro de fluorescencia en ausencia de ligando en color rojo, cuyo valor disminuye cuando se agrega la maltosa (azul, 30 μ M de maltosa), sugiriendo que en presencia de maltosa, existen cambios en la estructura terciaria que modifican la exposición de los residuos aromáticos. Estos datos indican que efectivamente estas proteínas pueden interactuar con el ligando. Además, se incluyeron en los experimentos de fluorimetría únicamente al ligando (F) con la finalidad de determinar si la maltosa *per se* genera cambios en la fluorescencia, efecto que fue descartado debido a que los cambios en los espectros de fluorescencia son despreciables.

Por otro lado, se utilizó como control negativo al dímero AKIN β γ (Δ SBD)- β 3 utilizando las mismas concentraciones de maltosa que fueron empleadas con las otras muestras (Figura 14.E). También, se realizó un experimento donde se utilizó al dímero AKIN β γ (Δ SBD)- β 3 y a la sacarosa como ligando en las mismas concentraciones que se probaron con la maltosa (Figura 14.E, verde). En presencia de cualquiera de estos disacáridos, los espectros de fluorescencia no cambiaron, lo que sugiere que en estas condiciones, el dímero es incapaz de interactuar con estos azúcares.

Con los resultados obtenidos de los espectros de fluorescencia, se calcularon los valores de fluorescencia relativa a 330 nm con cada concentración de maltosa empleada. Se consideró como 1 al valor de la fluorescencia emitida por la proteína a 330 nm en ausencia del ligando (Figura 14, rojo).

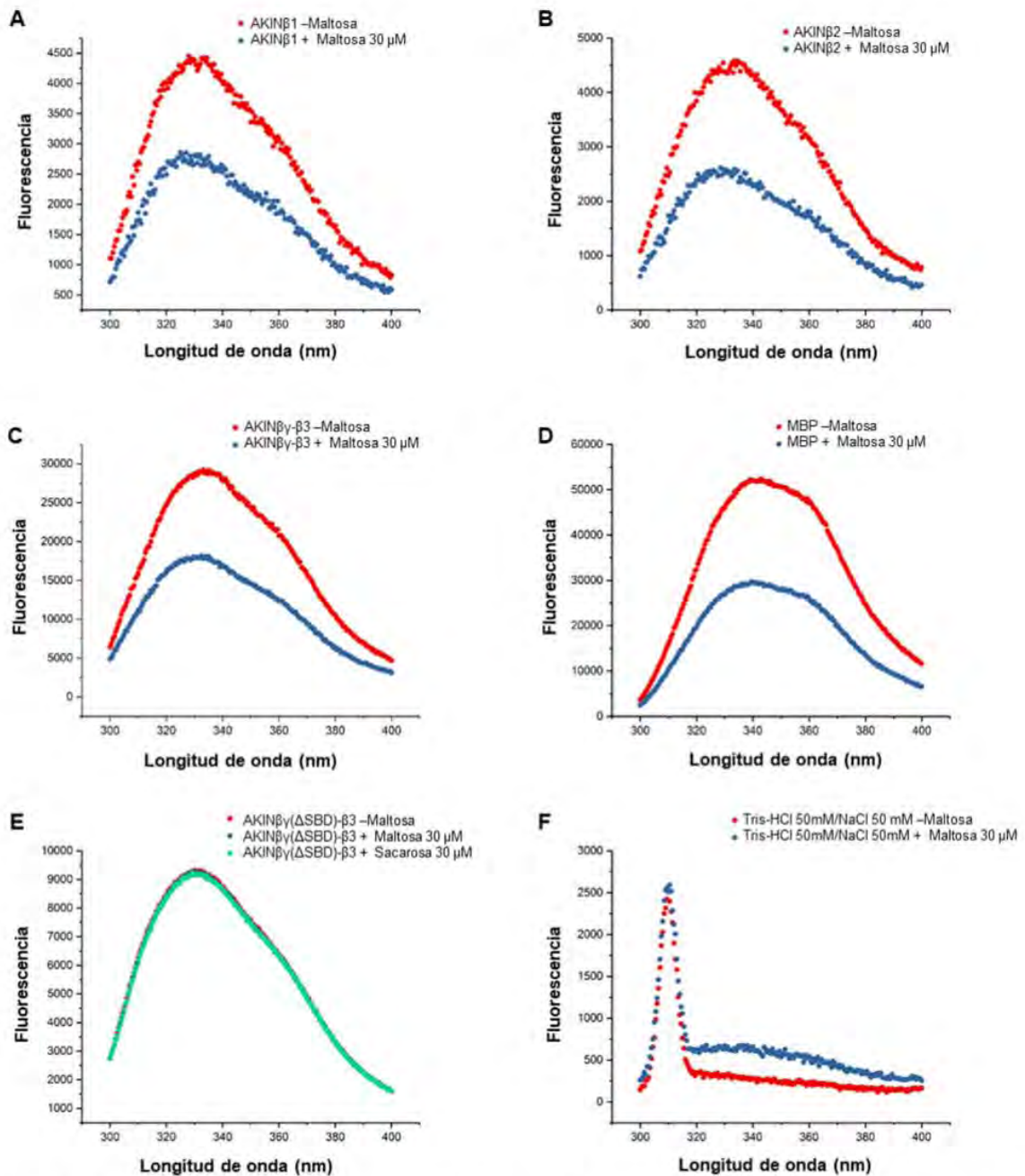


Figura 14. Espectros de fluorescencia. Emisión de la fluorescencia de las subunidades AKIN β 1 (A) y AKIN β 2 (B), así como de los dímeros AKIN β γ - β 3 (C) y AKIN β γ (Δ SBD)- β 3 (E) en ausencia (rojo) y en presencia de 30 μ M de maltosa (azul). También se incluyó como control a la MBP (D) y a la solución amortiguadora con la que se realizaron los ensayos (F) para descartar que los cambios se deban a la presencia de la maltosa. Particularmente con el dímero AKIN β γ (Δ SBD)- β 3, se utilizó también sacarosa con la cual no se observa ningún cambio en el espectro de fluorescencia.

En la Figura 15, se observa el cambio en la fluorescencia relativa dependiente de la concentración de maltosa en el medio con una concentración de proteína de 3.0 μM . Al ajustar los datos a una cinética de unión de un solo sitio (Figura 15) se logró determinar que las constantes de disociación (K_d) para las proteínas MBP, AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN $\beta\gamma$ - β 3 son de 5.139, 6.817, 12.670 y 8.996 μM si se emplea una concentración de proteína de 0.30 μM (Anexo 3) y de 5.099, 10.800, 13.900 y 7.451 μM , respectivamente si la concentración de la proteína se aumenta a 3.0 μM (Tabla 1).

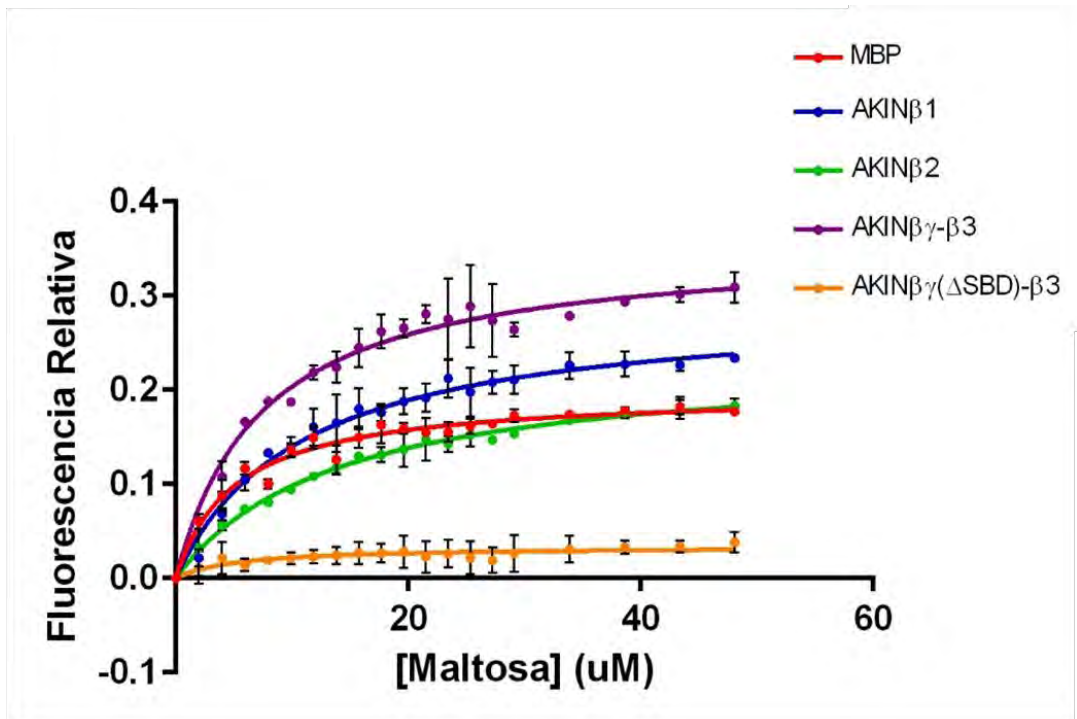


Figura 15. Cinética de unión entre las subunidades SnRK1 β y la maltosa. Los cambios en la fluorescencia graficados en función de la concentración de maltosa permitieron calcular las K_d s de las subunidades AKIN β 1 (azul) y AKIN β 2 (verde) así como del dímero AKIN $\beta\gamma$ - β 3 (morado). Como control positivo se utilizó a la MBP (rojo) cuya K_d ha sido reportada previamente, el control negativo es el dímero AKIN $\beta\gamma$ (Δ SBD)- β 3 (anaranjado) que carece un dominio que le permita unir carbohidratos. Las curvas obtenidas para las proteínas AKIN β 1, AKIN β 2, AKIN $\beta\gamma$ - β 3 y MBP se ajustan a un modelo de un solo sitio, mientras que los datos del negativo se ajustan a una ecuación de línea recta.

Las K_d s calculadas a partir de estos datos, sugieren una alta afinidad en la unión entre las proteínas SnRK1 β y la maltosa, todas ellas se encuentran en el orden μM . Cabe resaltar que la K_d calculada para la MBP, utilizada como control positivo, es de aproximadamente 5 μM , que se encuentra cercana a la reportada en diferentes experimentos que es de 3.5

μM (Miller et al., 1983; Telmer & Shilton, 2003). Este dato permite validar el método empleado y también a las Kds calculadas para las otras proteínas AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN $\beta\gamma$ - β 3.

Tabla 1. Constantes de disociación calculadas para la unión entre las proteínas SnRK1 β y la maltosa..

Kd (μM)	Concentración de Proteína		
	Proteína	0.3 μM	3.0 μM
MBP		5.139 \pm 0.381	5.099 \pm 0.467
AKIN β 1		6.817 \pm 0.942	10.800 \pm 0.992
AKIN β 2		12.670 \pm 1.714	13.900 \pm 1.226
AKIN $\beta\gamma$ - β 3		8.996 \pm 0.776	7.451 \pm 0.808
AKIN $\beta\gamma$ (Δ SBD)- β 3	NA	NA	NA

NA (no aplica)

4. Actividad de SnRK1 en presencia de maltosa

Aunque los resultados anteriores indican que las subunidades reguladoras tipo β del complejo SnRK1 pueden unirse a maltosa, es necesario evaluar si existe un impacto debido a esta interacción en la actividad de la cinasa. Para lo cual, se midió inicialmente la actividad de SnRK1 en extractos desalados de hojas de *A. thaliana* recolectadas a diferentes horas del día usando como sustrato al péptido AMARA (AMARAASAAALARRR).

Los resultados obtenidos al medir la actividad (Figura 16) muestran, que la actividad específica de SnRK1 en un extracto desalado de hojas es considerablemente alta al inicio del día (6 a.m.) mientras que en las horas consecutivas (12 y 6 p.m.) la actividad de la cinasa disminuya aproximadamente un 50%, independientemente de la presencia de la maltosa. Esto sugiere que el complejo SnRK1 se encuentra más activo después de que finaliza la noche, lo cual podría tener importancia fisiológica que es necesario evaluar. Es interesante resaltar que la presencia de 200 μM de maltosa parece no tener un efecto en la actividad de SnRK1 en extractos desalados de hojas recolectadas a las 6:00 a.m. y 12 p.m. Sin embargo, el análisis estadístico señala que a las 18:00 p.m. existen diferencias significativas en la actividad de la cinasa en presencia de maltosa, haciendo que esta baje aproximadamente 25% respecto al extracto desalado. Estos datos sugieren la formación diferencial de complejos que responden o no a la presencia de la maltosa.

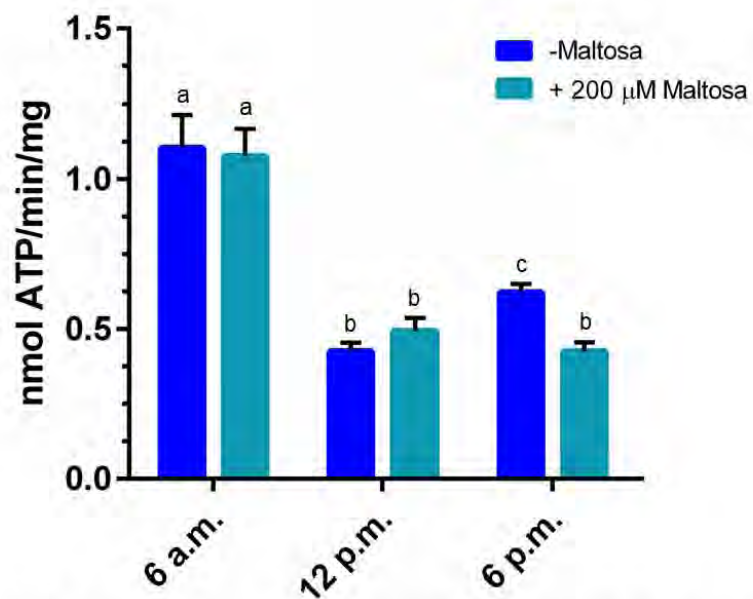


Figura 16. Actividad de SnRK1 en presencia de maltosa. Se midió la actividad de SnRK1 en muestras de hojas recolectadas a las 6 a.m., 12 p.m. y 6 p.m. en ausencia y presencia de maltosa (ANOVA, $p \leq 0.01$). Se observa un incremento en la actividad de SnRK1 en extractos de las 6 a.m. que baja en las horas posteriores del día. A las 6 p.m. la presencia de la maltosa promueve una disminución en la actividad de aproximadamente 25%.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La detección inmunohistoquímica reportada con anterioridad sugiere que una fracción de las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ se localiza en el citosol (Ávila-Castañeda et al., 2014; Ruiz-Gayosso, datos no publicados). Esta información se corroboró mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión, donde se demostró que una fracción de AKIN β 1 y AKIN β 2 se encuentran en el citosol, mientras que las subunidades AKIN β 3 y AKIN β γ se encuentran en grandes cantidades tanto en el citosol como en el interior de los cloroplastos, donde también se encuentran asociadas a gránulos de almidón (Ruiz-Gayosso, datos no publicados). Estos datos coinciden con la búsqueda de las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ en gránulos de almidón provenientes de hojas de *A. thaliana*, donde únicamente fue posible detectar a la subunidad AKIN β γ junto con las cinasas AKIN10/SnRK1.1 y AKIN11/SnRK1.2 (Gutiérrez-Granados, 2012), pero no a AKIN β 1 ni a AKIN β 2.

Estas evidencias abren un panorama interesante debido a que sugieren que los únicos complejos asociados de manera natural al almidón, son los conformados por AKIN β γ y AKIN β 3, los cuales se inhiben en presencia del polisacárido (Ávila-Castañeda et al., 2014) de manera similar a lo que ocurre con AMPK en presencia de glucógeno (McBride et al., 2009), lo que impide su actividad sobre blancos enzimáticos.

A pesar de que el papel de SnRK1 en el interior de los cloroplastos parece ser un poco más claro, aún permanece la interrogante sobre las funciones de las subunidades reguladoras tipo β en el citosol. En este compartimento, no hay almidón disponible para interactuar con las subunidades, lo que hace imposible el contacto entre las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ y el almidón. La presencia de las subunidades SnRK1 β en el citosol, sugiere funciones adicionales no relacionadas con la molécula de almidón.

Se ha comprobado por diferentes grupos de investigación, que el complejo SnRK1 es sensible a la presencia de carbohidratos como la sacarosa y la glucosa (Baena-González et al., 2007) así como a azúcares fosfato como la G1P, G6P y T6P, los cuales se encuentran solubles en el citosol. Estos azúcares actúan como inhibidores de la actividad de SnRK1, efecto que se ha observado únicamente en extractos desalados de hojas jóvenes, no en extractos de hojas maduras. Cuando a estos últimos se les complementa con extracto de

hojas jóvenes, el efecto inhibitorio de estos azúcares se recupera, lo que sugiere la participación de un intermediario, aún no identificado, necesario abatir la actividad de SnRK1 presente únicamente en tejido joven (Nunes et al., 2013). Experimentos preliminares de unión donde se midió la fluorescencia intrínseca de las subunidades SnRK1 β , no mostraron cambios en los espectros de emisión, lo que sugiere que la sacarosa, la glucosa, la G1P, G6P y T6P no son ligandos de SnRK1. Estos datos, refuerzan la hipótesis de un intermediario que permite la inhibición de la actividad de SnRK1 por parte de estos azúcares.

Por otra parte, se tienen evidencias que relacionan al complejo SnRK1 con la degradación del almidón, durante el cual se producen diversos azúcares que se distribuyen desde las hojas hacia raíces, flores o semillas. Durante este proceso, se genera dentro de los cloroplastos una gran cantidad de maltosa que se transporta hacia el citosol donde es metabolizada posteriormente (Streb & Zeeman, 2012). En los ensayos preliminares de unión, se observó una disminución en el espectro de fluorescencia correspondiente a las proteínas SnRK1 β en presencia de maltosa, lo que sugiere que este disacárido puede ser un ligando del SBD presente en estas subunidades.

Para evaluar la capacidad de AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ para unir maltosa, se clonó la secuencia codificante de estas subunidades (Figura 10) y se sobreexpresó (Figura 11) y purificó a la proteína de manera recombinante (Figura 12). Durante la obtención de la proteína resalta que de manera monomérica no fue posible purificar a las subunidades AKIN β 3 y AKIN β γ , al igual que a la versión mutada AKIN β γ (Δ SBD). En el caso de AKIN β 3, esta se acumula durante la sobreexpresión en la FS. A pesar de que tiene la etiqueta 6xHis en el C-terminal, esta no se encuentra expuesta para unirse a la resina de Ni-TED (Anexo 2), probablemente debido a las propiedades estructurales de AKIN β 3, por lo que es no es posible purificarla por este método. Las formas monoméricas de AKIN β γ y AKIN β γ (Δ SBD), se acumulan en su totalidad en la FI, lo que imposibilita la purificación. La estrategia que se utilizó para obtener a estas proteínas, fue coexpresar a estas subunidades para facilitar la formación de dímeros (Maya-Bernal et al., 2017), los cuales favorecen la presencia de AKIN β γ en la FS y permiten la purificación del dímeros a través de la subunidad AKIN β 3. Estos datos sugieren que al llevar a cabo la formación de los dímeros las subunidades AKIN β γ y AKIN β 3 sufren modificaciones en la estructura terciaria que permiten por un lado que el C-terminal de AKIN β 3 quede expuesto al medio acuoso en el que está la proteína y

por otro lado favorecen la acumulación de una fracción de AKIN $\beta\gamma$ en la FS. Debido a que durante la formación del dímero AKIN $\beta\gamma$ (Δ SBD) ocurren los mismos efectos que con la versión completa de AKIN $\beta\gamma$, estos datos parecen indicar que durante la formación del dímero y los cambios que ocurren a nivel estructural son independientes del SBD de AKIN $\beta\gamma$. Sería de gran importancia y utilidad estudiar en detalle los fenómenos que tienen lugar a nivel estructural durante la formación de los dímeros y trímeros compuestos por las subunidades del complejo SnRK1 y evaluar su efecto en la actividad.

En cuanto a los ensayos de unión a maltosa, se utilizó como control positivo a la MBP. Esta es una proteína de origen bacteriano que participa en el transporte de maltodextrinas (Walker et al., 2010). Los estudios estructurales de la MBP demuestran que consiste de dos dominios que forman un surco donde se une la maltosa o carbohidratos relacionados (Duan & Quioco, 2002, Sharff et al., 1992; Spurlino et al., 1991). Del lado opuesto al surco se localiza un asa que permite la movilidad de los dos dominios para dar lugar a dos diferentes conformaciones (Telmer & Shilton, 2003). La primera de ellas es la conformación cerrada que favorece la unión con el ligando, mientras que la conformación abierta promueve la liberación de la maltosa (Walker et al., 2010). Esta última es la forma predominante de la MBP en solución, sin embargo la conformación cerrada también está presente (Shilton et al., 1996). Ambas conformaciones adoptadas por la proteína podrían corresponder a las bandas observadas en los resultados de la movilidad de retardo electroforético (Figura 13) en ausencia de carbohidratos. En presencia de maltosa es posible observar algunas bandas más, las cuales podrían corresponder a las dos diferentes conformaciones así como a las proteínas que están interactuando con los carbohidratos.

En el caso de las subunidades AKIN β 1 y AKIN β 2, estos experimentos confirman que pueden unirse a gránulos de almidón, como sucede con AMPK β 1 al glucógeno en mamíferos (McBride et al., 2009; Koay et al., 2009). La migración de AKIN β 1 y AKIN β 2 en los diferentes geles sugiere que ambas subunidades pueden unirse a la amilopectina y a la maltosa. En los ensayos de unión al almidón reportados previamente (Ávila-Castañeda et al., 2014), se observa que AKIN β 2 puede unirse a gránulos de almidón, donde además de la amilopectina, también está presente la amilosa. Para tener un panorama más completo que permita entender de manera más clara lo que ocurre en la interacción con los gránulos de almidón, sería de utilidad incluir en los geles de afinidad a la amilosa y evaluar el comportamiento de las subunidades SnRK1 β frente a este polisacárido. El experimento

realizado en presencia de ambos carbohidratos, sugiere que las proteínas AKIN β 1 y AKIN β 2 tienen una mayor afinidad por la maltosa que por la amilopectina, sin embargo es importante tomar en cuenta que la concentración de maltosa es mayor que la de amilopectina. Para validar este comportamiento es necesario realizar la electroforesis con concentraciones equivalentes de amilopectina y maltosa.

El caso del dímero AKIN β γ - β 3 es interesante porque se sabe que en forma monomérica, la subunidad AKIN β γ puede unirse a gránulos de almidón en experimentos *in vitro* y que se encuentra asociada al almidón de manera natural (Ávila-Castañeda et al., 2014). Además, se ha observado que el dímero AKIN β γ - β 3 puede disociarse conforme pasa el tiempo, por lo que es probable que en la muestra estén presentes las subunidades AKIN β γ y AKIN β 3, así como el dímero AKIN β γ - β 3 (Maya-Bernal, 2017). En la electroforesis de afinidad se observan varias bandas que podrían corresponder a cada una de las poblaciones presentes en la muestra. Considerando el patrón de bandas que se observa, aparentemente no hay cambio en la migración de la muestra AKIN β γ - β 3 debida a la presencia de la amilopectina. Este fenómeno puede deberse a que en complejo con AKIN β 3, la subunidad AKIN β γ pierde afinidad por la amilopectina, o bien que no sea la amilopectina la molécula a la cual se une la subunidad AKIN β γ sino a la amilosa, presente también en los gránulos de almidón. En presencia de maltosa, se produce un patrón de bandas diferente a cuando el ligando se encuentra ausente. Aunque es difícil saber la identidad de las proteínas presentes en cada banda, los cambios observados sugieren que el dímero AKIN β γ - β 3 o AKIN β γ son capaces de interactuar con la maltosa.

Los controles negativos AKIN β 3 y AKIN β γ (Δ SBD)- β 3 no pueden unir ni maltosa ni amilopectina a las concentraciones de carbohidratos empleadas en los ensayos. Algunos datos reportados anteriormente sugieren que a pesar de que AKIN β 3 carece del SBD, esta puede formar complejos funcionales con las otras subunidades (Gissot et al., 2004; Gissot et al., 2006) aunque en este caso, AKIN β 3 no aportaría un mecanismo de regulación del complejo relacionado con los carbohidratos. De manera similar a lo que ocurre con AKIN β γ - β 3, el dímero AKIN β γ (Δ SBD)- β 3 se disocia conforme avanza el tiempo. En estas muestras está presente el dímero así como AKIN β γ (Δ SBD) y AKIN β 3, sin embargo debido a que en ninguno de los casos está presente un módulo que permita la unión con carbohidratos, no se observan cambios en la migración de las bandas.

Por otro lado, cuando una muestra de proteína es excitada a 280 nm, los grupos aromáticos de los aminoácidos absorben energía que después emiten en forma de fluorescencia. Se considera que el triptófano (W) es el aminoácido con propiedades espectroscópicas más abundante en las proteínas (Lakowicz, 2006). El grupo indol del W es la fuente predominante de absorbanza a 280 nm y de emisión a aproximadamente 350 nm. Esta propiedad ha sido ampliamente utilizada para el análisis de cambios conformacionales de las proteínas o bien, para la evaluación de la capacidad para unir ligandos (Ghisaidoobe & Chung, 2014). Naturalmente y en ausencia de ligandos, las proteínas emiten fluorescencia dependiendo del número y la disposición de los W, al estar unidas a algún tipo de molécula, la fluorescencia emitida por los W puede cambiar. En el caso particular de los CBM, se sabe que en estos están presentes uno o dos W que permiten llevar a cabo la interacción con el ligando (Christiansen et al., 2009). El ligando al estar unido al CBM a través de los W, causa una disminución en la fluorescencia emitida por los W que se encuentran en el sitio de unión. Los espectros de las subunidades AKIN β 1 y AKIN β 2, así como los dímeros AKIN β γ - β 3 y AKIN β γ (Δ SBD) recolectados entre 300 y 400 nm (Figura 14) muestran una disminución en la fluorescencia, lo que sugiere que estas proteínas son capaces de unir maltosa. El ajuste de los datos permitió calcular Kd que se encuentran en el orden micromolar, lo que sugiere una alta afinidad de AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ - β 3 por la maltosa. La Kd calculada para la MBP es aproximadamente de 5 μ M, que se encuentra cercana al valor reportado por otros grupos de investigación (Miller et al., 1983; Telmer & Shilton, 2003; Walker et al., 2010) con valores entre 2 y 3.5 μ M. La MBP no sólo fue útil como un ejemplo de una proteína que puede interactuar con la maltosa, sino también como un control positivo para validar tanto la metodología empleada como los cálculos que se realizaron para determinar la Kd. A diferencia de lo que sucede con las subunidades que tienen un SBD, los espectros del dímero AKIN β γ (Δ SBD)- β 3 en presencia de maltosa o sacarosa no cambian lo que sugiere que este dímero es incapaz de unir maltosa, probablemente debido a la ausencia de un dominio que le permita establecer la interacción.

Es muy interesante que las constantes de disociación que se calcularon para las proteínas AKIN β 1, AKIN β 2, AKIN β γ - β 3 sean del orden micromolar (Tabla 1), lo cual sugiere que estas subunidades tienen una alta sensibilidad hacia la maltosa. Esto último podría tener importantes implicaciones fisiológicas debido a que las subunidades reguladoras SnRK1 β podrían detectar a la maltosa producida en las hojas durante la degradación del almidón incluso en concentraciones bajas.

Es importante resaltar que estos experimentos se realizaron con las subunidades monoméricas o bien con los dímeros, sin embargo, se sabe que la forma activa de la cinasa SnRK1 está constituida por trímeros compuestos por una subunidad catalítica, una subunidad reguladora β y otra γ . Es posible que en forma mono o dimérica, las subunidades SnRK1 β puedan interactuar con la maltosa, pero que en forma de heterotrímeros la afinidad cambie o que de hecho no se establezca la unión. Potencialmente, todos los complejos SnRK1 que contengan una subunidad SnRK1 β pueden unir maltosa, sin embargo la actividad de SnRK1 proveniente de hojas recolectadas a diferentes horas del día (Figura 16) sugiere que no hay diferencias en la actividad de los extractos desalados en presencia de maltosa a las 6 a.m. y 12 p.m. a diferencia de lo que sucede a las 6 p.m., donde de acuerdo al análisis estadístico, la actividad de SnRK1 disminuye significativamente. Estos datos sugieren que durante este periodo de tiempo, están presentes complejos SnRK1 que son sensibles a la presencia de la maltosa.

Es necesario considerar que durante la degradación del almidón, también están activas las enzimas que permiten el metabolismo de la maltosa, como la DPE2 citoplásmica (Chia et al., 2004) haciendo que la concentración real de la maltosa en el ensayo sea menor a la calculada y que el efecto del disacárido pueda enmascarse. Por esta razón, es necesario complementar estos ensayos incrementando la concentración total de maltosa y explorar alternativas que permitan enriquecer la presencia y actividad de SnRK1 en una fracción.

Por otra parte, estos mismos resultados muestran que al inicio del día, la actividad de SnRK1 es considerablemente más alta respecto a las horas posteriores. Considerando el papel que tiene la SnRK1 en el restablecimiento de la homeostasis energética (Baena-Gonzalez et al., 2007), podría ser relevante que tras la degradación de los gránulos de almidón la SnRK1 deba encontrarse lista para activar los mecanismos necesarios en caso de evento de estrés.

VIII. CONCLUSIONES

- Las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN $\beta\gamma$ del complejo SnRk1 pueden unir maltosa y aparentemente esta interacción modifica la actividad de la cinasa en un extracto desalado de hojas de *A. thaliana* recolectadas cuando ha iniciado la producción de maltosa a partir de almidón.
- Las constantes de disociación, calculadas a partir de experimentos *in vitro*, para las proteínas AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN $\beta\gamma$ - β 3 son 10.8, 13.9 y 7.5 μ M respectivamente.
- Las constantes de disociación se encuentran en el rango micromolar, lo cual sugiere una alta afinidad de las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN $\beta\gamma$ - β 3 por la maltosa.
- El dímero AKIN $\beta\gamma$ (Δ SBD)- β 3 es incapaz de unir maltosa o sacarosa.
- La actividad de SnRK1 en hojas de *A. thaliana* varía a lo largo del día, siendo el punto más alto al inicio del periodo luminoso.

IX. PERSPECTIVAS

Como parte de las perspectivas generales del proyecto, es necesario corroborar por diferentes técnicas de microscopía la localización subcelular de las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ del complejo SnRK1. Para esto, se pueden generar fusiones a la proteína reportera verde fluorescente (GFP). También es posible aprovechar los anticuerpos específicos de cada subunidad para la técnica de inmunodetección acoplada a partículas de oro (Immuno-gold), con la cual sería posible determinar a una mayor resolución la localización de cada una de estas proteínas.

Es importante complementar la caracterización de la unión entre las proteínas AKIN β 1, AKIN β 2 y AKIN β γ - β 3 y la maltosa con otras técnicas fisicoquímicas que permitan validar las constantes de disociación obtenidas a partir de los experimentos de fluorimetría. Entre algunas de las aproximaciones experimentales más empleadas para determinar la interacción entre un ligando y una proteína se puede mencionar a la fluorimetría de barrido diferencial (Differential Scanning Fluorimetry) que permite relacionar la estabilidad térmica de la proteína con la concentración de ligando (Vivoli et al., 2014).

A pesar de que se ha presentado clara evidencia sobre la interacción de las subunidades SnRK1 β con la maltosa, no se cuenta con elementos que sugieran que este disacárido tiene una influencia en la actividad de la cinasa, y se desconocen los efectos de esta interacción. Una de las probables repercusiones de esta interacción, podría ser la re-localización subcelular tanto de las subunidades SnRK1 β como del heterotrímero. Por esta razón, se sugiere realizar ensayos que permitan determinar si en presencia de maltosa las subunidades AKIN β 1, AKIN β 2, AKIN β γ y AKIN β 3 cambian su localización subcelular. Una herramienta importante para obtener información de este tipo es la mutante *dpe2*, donde la expresión de la enzima DPE2 se encuentra abatida y acumula grandes cantidades de maltosa (Chia et al., 2004). En este contexto, la maltosa se produce al interior de los cloroplastos y posteriormente se transporta hacia el citoplasma donde ya no puede ser metabolizada y se acumula hasta 200 veces más que en una planta de tipo silvestre.

Por otro lado, la actividad de SnRK1 en extractos desalados provenientes de hojas de *A. thaliana* parece no modificarse en presencia de maltosa. Sin embargo, es importante considerar que al tratarse de un extracto proteico, están presentes otras proteínas que

pueden estar enmascarando la actividad de SnRK1 y el efecto de la maltosa. Además, como una manera de evidenciar este efecto, se deben realizar ensayos con un incremento en la concentración de maltosa debido a la presencia de enzimas que degradan al disacárido durante la degradación del almidón. Una herramienta valiosa generada en el laboratorio es el ensamblaje de complejos SnRK1 recombinantes que pueden evaluarse de manera individual para conocer con mayor precisión el comportamiento de cada uno de ellos en presencia de la maltosa.

X. ANEXOS

ANEXO 1

1. Comparación de la secuencia del cDNA clonado (Aβ1His) con la reportada en TAIR de AKINβ1 (AT5G21170)

```
Aβ1His  F C L T L R R R Y T M G N A N G K D E D D P S A R S R H R R P S S D S M S S S P 180
          TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGAAATGCGAACGGCAAAGACGAAGACGATCCTTCTGCACGCAGTCGTACCGTCGTCCTTCTTCAGACTCTATGAGCAGTTCTCCT
          #####|
TAIR     -----ATGGGAAATGCGAACGGCAAAGACGAAGACGATCCTTCTGCACGCAGTCGTACCGTCGTCCTTCTTCAGACTCTATGAGCAGTTCTCCT 150
          M G N A N G K D E D D P S A R S R H R R P S S D S M S S S S P

Aβ1His  P G S P A R S P S P F L F A P Q V P V A P L Q R A N A P P P N N I Q W N Q S Q R 300
          CCCGGAAGTCCTGCTCGATCTCCATCTCCTTTCTTATTCGCTCCTCAGGTTCCCGTGGCTCCATTGCAGAGAGCAAACGCCCTCCTCCTAATAACATCCAATGGAACCAATCACAGAGA
          |
TAIR     CCCGGAAGTCCTGCTCGATCTCCATCTCCTTTCTTATTCGCTCCTCAGGTTCCCGTGGCTCCATTGCAGAGAGCAAACGCCCTCCTCCTAATAACATCCAATGGAACCAATCACAGAGA 270
          P G S P A R S P S P F L F A P Q V P V A P L Q R A N A P P P N N I Q W N Q S Q R

Aβ1His  V F D N P P E Q G I P T I I T W N Q G G N D V A V E G S W D N W R S R K K L Q K 420
          GTTTTTGATAATCCCCCAGAGCAAGGAATCCCTACCATCATTACATGGAACCAAGGAGGTAATGATGTGGCGGTGGAAGGATCATGGGACAATTGGAGATCAAGGAAGAAGCTGCAGAAA
          |
TAIR     GTTTTTGATAATCCCCCAGAGCAAGGAATCCCTACCATCATTACATGGAACCAAGGAGGTAATGATGTGGCGGTGGAAGGATCATGGGACAATTGGAGATCAAGGAAGAAGCTGCAGAAA 390
          V F D N P P E Q G I P T I I T W N Q G G N D V A V E G S W D N W R S R K K L Q K

Aβ1His  S G K D H S I L F V L P S G I Y H Y K V I V D G E S K Y I P D L P F V A D E V G 540
          TCAGGGAAAGACCACTCGATTCTCTTTGTCCTTCCATCTGGCATATACCACTACAAGGTGATGTGGACGGTGAATCAAATACATCCCAGATTTACCTTTGTAGCAGACGAAGTTGGC
          |
TAIR     TCAGGGAAAGACCACTCGATTCTCTTTGTCCTTCCATCTGGCATATACCACTACAAGGTGATGTGGACGGTGAATCAAATACATCCCAGATTTACCTTTGTAGCAGACGAAGTTGGC 510
          S G K D H S I L F V L P S G I Y H Y K V I V D G E S K Y I P D L P F V A D E V G
```

Aβ1His N V C N I L D V H N F V P E N P E S I V E F E A P P S P D H S Y G Q T L P A A E 660
 AATGTCTGTAACATTCTCGATGTTTCATAACTTTGTGCCAGAAAACCCAGAAAGCATAGTGGAGTTTGAGGCGCCACCATCACCTGATCATAGCTACGGTCAAACCCCTACCAGCCGCAGAA 630
 TAIR N V C N I L D V H N F V P E N P E S I V E F E A P P S P D H S Y G Q T L P A A E

Aβ1His D Y A K E P L A V P P Q L H L T L L G T T E E T A I A T K P Q H V V L N H V F I 780
 GATTACGCGAAAGAGCCACTGGCGGTGCCACCTCAGCTTCATCTAACACTTCTTGGCACTACTGAAGAGACAGCCATAGCCCAAAGCCTCAACATGTGGTGCTTAACCATGTGTTTCATA 750
 TAIR D Y A K E P L A V P P Q L H L T L L G T T E E T A I A T K P Q H V V L N H V F I

Aβ1His E Q G W T P Q S I V A L G L T H R F E S K Y I T V V L Y K P L T R N S S S V D K 900
 GAGCAAGGATGGACTCCTCAATCCATAGTAGCTTTGGGTTTAACCCACAGGTTTCGAGTCTAAGTACATAACTGTTGTCCTCTACAAACCGCTCACACGGAATTCGAGCTCCGTCGACAAG 849
 TAIR E Q G W T P Q S I V A L G L T H R F E S K Y I T V V L Y K P L T R *

Aβ1His L A A A L E H H H H H H * 939
 CTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACTGA 849
 TAIR #####

2. Comparación de la secuencia del cDNA clonado (Aβ2His) con la reportada en TAIR de AKINβ2 (AT4G16360)

```

Aβ2His  R R Y T M A M S A A S D G N H V A P P E L M G Q S P P H S P R A T Q S P L M F A
AGGAGATATACCATGGCTATGTCTGCTGCTTCTGATGGTAACCATGTCGCTCCTCCTGAGCTTATGGGTCAATCTCCTCCTCATAGCCCTCGAGCTACTCAGTCTCCTCTCATGTTTGCT 120
#####|
-----ATGGCTATGTCTGCTGCTTCTGATGGTAACCATGTCGCTCCTCCTGAGCTTATGGGTCAATCTCCTCCTCATAGCCCTCGAGCTACTCAGTCTCCTCTCATGTTTGCT 108
TAIR    M A M S A A S D G N H V A P P E L M G Q S P P H S P R A T Q S P L M F A

Aβ2His  P Q V P V L P L Q R P D E I H I P N P S W M Q S P S S L Y E E A S N E Q G I P T
CCTCAGGTTCCGGTGCCTTCCACTTCAAAGACCTGATGAAATTCATATCCCTAATCCTTCGTGGATGCAATCGCCATCTTCGTTGTATGAAGAAGCTTCTAACGAACAAGGAATCCCTACG 240
|
CCTCAGGTTCCGGTGCCTTCCACTTCAAAGACCTGATGAAATTCATATCCCTAATCCTTCGTGGATGCAATCGCCATCTTCGTTGTATGAAGAAGCTTCTAACGAACAAGGAATCCCTACG 228
TAIR    P Q V P V L P L Q R P D E I H I P N P S W M Q S P S S L Y E E A S N E Q G I P T

Aβ2His  M V T W C H G G K E I A V E G S W D N W K T R S R L Q R S G K D F T I M K V L P
ATGGTCACTTGGTGTCTATGGAGGCAAGGAGATTGCTGTGGAGGGATCATGGGATAAATGGAAGACAAGAAGTCGGCTGCAGAGATCTGGGAAGGACTTCACATCATGAAAGTGTTACCT 360
|
ATGGTCACTTGGTGTCTATGGAGGCAAGGAGATTGCTGTGGAGGGATCATGGGATAAATGGAAGACAAGAAGTCGGCTGCAGAGATCTGGGAAGGACTTCACATCATGAAAGTGTTACCT 348
TAIR    M I T W C H G G K E I A V E G S W D N W K T R S R L Q R S G K D F T I M K V L P

Aβ2His  S G V Y E Y R F I V D G Q W R H A P E L P L A R D D A G N T F N I L D L Q D Y V
TCAGGAGTCTATGAGTACAGGTTTATGTGGATGGACAGTGGAGGCATGCCCTGAGCTCCCTTTAGCTAGAGATGATGCTGGGAACACTTCAACATTTTGGATCTTCAGGACTATGTT 480
|
TCAGGAGTCTATGAGTACAGGTTTATGTGGATGGACAGTGGAGGCATGCCCTGAGCTCCCTTTAGCTAGAGATGATGCTGGGAACACTTCAACATTTTGGATCTTCAGGACTATGTT 468
TAIR    S G V Y E Y R F I V D G Q W R H A P E L P L A R D D A G N T F N I L D L Q D Y V

Aβ2His  P E D I Q S I S G F E P P Q S P E N S Y S N L L L G A E D Y S K E P P V V P P H
CCTGAAGACATTCAAAGCATATCTGGGTTTGAGCCTCCGCAATCTCCAGAGAATAGTTACAGCAACTTGCTTCTCGGAGCTGAGGACTACTCTAAAGAACCCTGTGGTTCCCCCGCAC 600
|
CCTGAAGACATTCAAAGCATATCTGGGTTTGAGCCTCCGCAATCTCCAGAGAATAGTTACAGCAACTTGCTTCTCGGAGCTGAGGACTACTCTAAAGAACCCTGTGGTTCCCCCGCAC 588
TAIR    P E D I Q S I S G F E P P Q S P E N S Y S N L L L G A E D Y S K E P P V V P P H

```


ANEXO 2

1. Expresión de la proteína recombinante AKIN β 3

Para intentar purificar a la subunidad AKIN β 3, ésta se sobreexpresó en células de *E. coli* DE3. Para identificar la presencia de esta proteína en la FS se llevó a cabo una detección tanto con el anticuerpo específico para esta subunidad (A) como con el anticuerpo que reconoce la etiqueta 6xHis (B). Se observa que AKIN β 3-His se acumula en la FS, y prácticamente no se detecta en la FI. Sin embargo, durante la purificación, una parte de la proteína no se une a la resina (NU) y es imposible recuperarla en las fracciones de elución. Este dato sugiere que la etiqueta no se encuentra expuesta al medio probablemente por las características estructurales de AKIN β 3, de tal manera que impide la interacción con la resina.

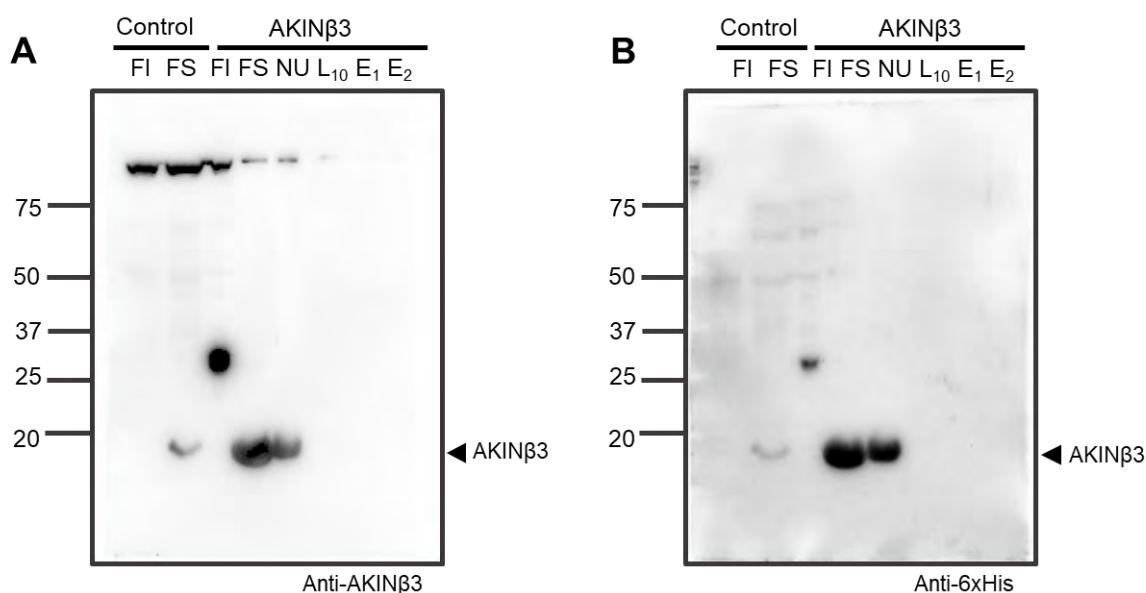


Figura A2. Identificación con anticuerpos de la subunidad AKIN β 3-His recombinante. La expresión y purificación de la subunidad AKIN β 3 se evaluó usando el anticuerpo específico para esta subunidad así como el de la etiqueta 6xHis. En ambos casos se observa la acumulación de AKIN β 3-His en la FS, sin embargo es incapaz de recuperarse en las eluciones con imidazol.

ANEXO 3

1. Gráfico de las Kd calculadas con 0.3 μM de proteína

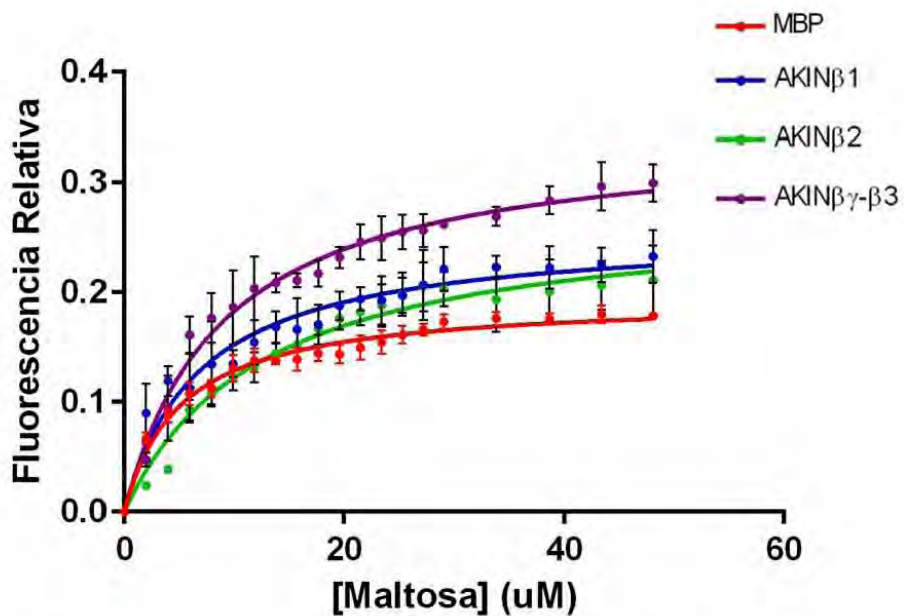


Figura A3. Cinética de unión entre las subunidades SnRK1 β y la maltosa. Los cambios en la fluorescencia graficados en función de la concentración de maltosa cuando la concentración de proteína es de 0.3 μM .

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alderson, A., Sabelli, P. A., Dickinson, J. R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Halford, N. G. (1991). Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *PNAS*, *88*(19), 8602–5.
- Amodeo, G., Rudolph, M. J., 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., Erickson, F. L. (2008). Interaction of the WD40 domain of a myoinositol polyphosphate 5-phosphatase with SnRK1 links inositol, sugar, and stress signaling. *Plant Physiol*, *148*, 1868-1882.
- Avila-Castañeda, A., Gutiérrez-Granados, N., Ruiz-Gayosso, A., Sosa-Peinado, A., Martínez-Barajas, E., & Coello, P. (2014). Structural and functional basis for starch binding in the SnRK1 subunits AKINβ2 and AKINβγ. *Front Plant Sci*, *5*(5), 199.
- Baena-González, E., & Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci*, *13*(9), 474–82.
- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, *448*(7156), 938–42.
- Bläsing, O. E., Gibos, Y., Günther, M., Höhne, M., Morcuende, R., Osuna, D., Stitt, M. (2005). Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, *17*(2), 3257-81.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, *72*, 248-254.
- Carling D., Aguan, K., Woods, A., Verhoeven, A. J., Beri, R. K. Brennan, C. H., Scott, J. (1994) Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J Biol Chem*, *269*(15), 11442-8.
- Celenza, J. L., Carlson, M. (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*, *233*, 1175-80.
- Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli, G., Chen, J., Zeeman, S. C., Smith, S. M., Smith, A., M. (2004). A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in *Arabidopsis* leaves at night. *Plant J*, *37*, 853-863.
- Cho, M.-H., Lim, H., Shin, D. H., Jeon, J.-S., Park, Y.-I., Hahn, T.-R. (2011). Role of the plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplast in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, *190*(1), 101-12.
- Christiansen, C., Hachem M. A., Janecek, S., Vikso-Nielsen, A., Blennow, A., Svensson, B. (2009). The carbohydrate-binding module family 20-diversity, structure, and function. *FEBS J*, *276*, 5006-5029.

- Coello, P., Martínez-Barajas, E. (2016). Changes in nutrient distribution are part of the mechanism that promotes seed development under severe nutrient restriction. *Plant Physiol Biochem*, *99*, 21-26.
- Crozet, P., Jammes, F., Valot, B., Ambard-Bretteville, F., Nessler, S., Hodges, M., Thomas, M. (2010). Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* sucrose non-fermenting related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *J Biol Chem*, *285*(16), 12017-7.
- Crozet, P., Margalha, L., Butowt, R., Fernandes, N., Elias, C. A., Orosa, B., Tomanov, K., Teige, M., Bachmair, A., Sadanandom, A., Baena-González, E. (2016). SUMOylation represses SnRK1 signaling in *Arabidopsis*. *Plant J*, *85*, 120-133.
- Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho, C., Adamo, M., Elias, C. A., Baena-González, E. (2014). Mechanisms of regulation of the SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Front Plant Sci*, *190*(5), 1-17.
- Delatte, T., Umhang, M., Trevisa, M., Eicke, S., Thorneycroft, D., Smith, S. M., Zeeman, S. C. (2006). Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants. *J Biol Chem*, *281*(17), 12050-9.
- Duan X., Quijcho F. A. (2002). Structural evidence for a dominant role of nonpolar interactions in the binding of a transport/chemosensory receptor to its highly polar ligands. *Biochem*, *41*, 706–712
- Elrouby, N., Coupland, G. (2010). Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify *Arabidopsis* proteins implicated in diverse biological processes. *PNAS*, *107*, 17415-17420.
- Fettke, J., Chia, T., Eckermann, N., Smith, A., Steup, M. (2006). A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG). *Plant J*, *46*(4), 668-84.
- Fettke, J., Eckermann, N., Poeste, S., Pauly, M., Steup, M. (2004). The glycan substrate of the cytosolic (Pho2) phosphorylase isozyme from *Pisum sativum* L.: identification, linkage analysis and subcellular localization. *Plant J*, *39*(6), 933-46.
- Fettke, J., Eckermann, N., Tiessen, A., Geigenberg, P., Steup, M. (2005). Identification, subcellular localization and biochemical characterization of water-soluble heteroglycans (SHG) in leaves of *Arabidopsis thaliana* L.: distinct SHG reside in the cytosol and in the apoplast. *Plant J*, *43*(4), 568-85.
- Fragoso, S., Espíndola, L., Páez-Valencia, J., Gamboa, A., Camacho, Y., Martínez-Barajas, E., Coello, P. (2009). SnRK1 isoforms AKIN10 and AKIN11 are differentially regulated in *Arabidopsis* plants under phosphate starvation. *Plant Physiol*, *149*, 1906-16.
- Gallegos-Pacheco, A. D. (2016). Expresión y caracterización de la subunidad AKINβγ de la SnRK1 de *Arabidopsis thaliana* sin el dominio de unión a carbohidrato (GBD). (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Ghillebert, R., Swinnen, E., Wen, J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., Winderickx, J. (2011). The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS J*, *278*(21), 3978–90.

- Ghisaiddobe A. B. T., Chung S. J., (2014). Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *Int J Mol Sci*, *15*, 22518-22538.
- Gissot, L., Polge, C., Bouly, J.-P., Lemaitre, T., Kreis, M., Thomas, M. (2004). AKINbeta3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic beta-subunits. *Plant Mol Biol*, *56*(5), 747–59.
- Gissot, L., Polge, C., Jossier, M., Girin, T., Bouly, J.-P., Kreis, M., Thomas, M. (2006). AKINbetagamma contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiol*, *142*(3), 931-44.
- Guérinier, T., Millan, L., Crozet, P., Oury, C., Rey, F., Valot, B., Glab, N. (2013). Phosphorylation of p27(KIP1) homologs KRP6 and 7 by SNF1-related protein kinase-1 links plant energy homeostasis and cell proliferation. *Plant J*, *75*(3), 515–25.
- Gutiérrez-Granados, N. (2012). Caracterización del Dominio de Unión a Glucógeno (GBD) presente en la subunidad reguladora AKIN $\beta\gamma$ del complejo SnRK1 de *A. thaliana*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Halford, N. G., Hey, S. J. (2009). Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem J*, *419*(2), 247-59.
- Hardie, D. G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway- new players upstream and downstream. *J Cell Sci*, *177*, 5479-87.
- Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev*, *8*(10), 774–85.
- Hardie, D. G., Carling D., Sim A. T. R.(1989). The AMP-activated protein kinase- a multisubstrate regulator of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci*, *14*, 20-23.
- Harthill, J. E., Meek, S. E. M., Morrice, N., Peggie, M. W., Borch, J., Wong, B. H. C., Mackintosh, C. (2006). Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J*, *47*(2), 211–23.
- Hedbacker, K., Townley, R., Carlson, M. (2004). Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates the subcellular localization of Snf1-Sip1 protein kinase. *Mol Cell Biol*, *24*(5), 1836-43.
- Hejazi, M., Fettke, J., Paris, O., Steup, M., (2009). The two plastidial starch-related dikinases sequentially phosphorylate glucosyl residues at the surface of both the A- and B-type allomorphs of crystallized maltodextrins but the mode of action differs. *Plant Physiol*, *150*(2), 962-76.
- Janecek, S., Svensson, B., MacGregor, E. A. (2011). Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals. *Enzyme Microbial Technol*, *49*(5), 429-40.
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Met*, *1*, 15-25.

- Kleinow, T., Bhalerao, R., Breuer, F., Umeda, M., Salchert, K., Koncz, C. (2000). Functional identification of an Arabidopsis *snf4* ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of *snf4* deficiency in yeast. *Plant J*, 23, 115-122.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lakowicz, J.R. (2000). Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 2, Protein Fluorescence; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Laurie, S., McKibbin, R. S., Halford, N. G. (2003). Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an α -amylase (α -Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *J Exp Bot*, 54, 739-47.
- Lin, Y., Lui, T., Lui, J., Lui, X., Ou, Y., Zhang, H., Li, M., Sonnewald, U., Song, B., Xie, C. (2015). Subtle regulation of potato acid invertase activity by a protein complex of invertase, invertase inhibitor, and sucrose nonfermenting1-related protein kinase. *Plant Physiol*, 168, 1807-1819.
- Lloyd, J. R., Blennow, A., Burhenne, K., Kossmann, J. (2004). Repression of a novel isoform of disproportionating enzyme (stSPE2) in potato leads to inhibition of starch degradation in leaves but not tubers stored at low temperature. *Plant Physiol*, 134(4), 1347-54.
- Lo, H.-F., Lin, L.-L., Chiang, W.-Y., Chie, M.-C., Hsu, W.-H., Chang C.-T. (2002). Deletion analysis of the C-terminal region of the alpha-amylase of Bacillus sp. Strain TS-23. *Arch Microbiol*, 178(2), 115-23.
- Lovas, A., Sós-Hegedus, A., Bimbó, A., Bánfalvi, Z. (2003). Functional diversity of potato SNF1-related kinases tested in Saccharomyces cerevisiae. *Gene*, 321, 123-9.
- Lu, Y., Sharkey, T. D. (2004). The role of amylomaltase in malose metabolism in the cytosol of photosynthetic cells. *Planta*, 21(3), 466-73.
- Lumbreras, V., Alba, M. M., Kleinow, T., Koncz, C., Pagès, M. (2001). Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Rep*, 2(1), 55-60.
- MacGregor, E. A., Janecek, S., Svensson, B. (2001). Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family of enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1546(1), 1-20.
- Maya-Bernal, J. L., Ávila, A., Ruiz-Gayosso, A., Trejo-Fregoso, R., Pulido, N., Sosa-Peinado, A., Zúñiga-Sánchez, E., Martínez-Barajas, E., Rodríguez-Sotres, R., Coello, P. (2017). Expression of recombinant SnRK1 in *E. coli*: characterization of adenine nucleotide binding to the SnRK1.1/AKIN β γ - β 3 complex. *Plant Sci*, 263, 116-125.
- McBride, A., Ghilagaber, S., Nikolaev, A., Hardie, D. G. (2009). The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Met*, 9(1), 23-34. R
- Mikami, B., Adachi, M., Kage, T., Sarikaya, E., Nanmori, T., Shinke, R., Utsumi, S. (1999). Structure of raw starch-digesting Bacillus cereus beta-amylase complexed with maltose. *Biochemistry*, 38(22), 7050-61.
- Miller, D. M., Olson, J. S., Pflugrath, J. W., Quiocbol, F. A. (1983). Rates of ligands binding to periplasmic proteins involved in bacterial transport and chemotaxis. *J Biol Chem*, 258(22), 13665-13672.

- Nashilevitz, S., Melamed-Bessudo, C., Aharoni, A., Kossmann, J., Wolf, S., Levy, A. A. (2009). The *legwd* mutant uncovers the role of starch phosphorylation in pollen development and germination in tomato. *Plant J*, 57(1), 1-13.
- Niittylä, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A. M., Zeeman, S. C. (2004). A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science*, 303(5654), 87-9.
- Nunes, C., Primavesi, L. F., Patel, M. K., Martinez-Barajas, E., Powers, S. J., Sagar, R., Paul, M. J. (2013). Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol Biochem*, 63, 89–98.
- Oakhill, J. S., Chen, Z.-P., Scott, J. W., Steel, R., Castelli, L. A., Ling, N., Kemp, B. E. (2010). B-subunit myristoylation is a gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *PNAS*, 107(45), 19237-41.
- Piattoni, C. V., Bustos D. M., Guerrero S. A., Iglesias A. A. (2011). Non phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated in wheat endosperm at Ser-404 by SNF1-related protein kinase allosterically inhibited by ribose-5-phosphate. *Plant Physiol*, 156(3), 1337-50.
- Pierre, M., Traverso, J. A., Boisson, B., Domenichini, S., Bouchez, D., Giglione, C., Meinel, T. (2007). N-Myristoylation regulates the SnRK1 pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19(9), 2804-2821.
- Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B. J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S. C., Stapleton, D. (2003). AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol*, 13(10), 867–71.
- Polekhina, G., Gupta, A., van Denderen, B. J. W., Feil, S. C., Kemp, B. E., Stapleton, D., Parker, M. W. (2005). Structural basis for glycogen recognition by AMP-activated protein kinase. *Structure*, 13(10), 1453–62.
- Polge, C., & Thomas, M. (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci*, 12(1), 20–8.
- Purcell, P. C., Smith A. M., Halford, N. G. (1998). Antisense expression of sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant J*, 26, 421-33.
- Radchuk, R., Emery, R. J. N., Weier, D., Vigeolas, H., Geigenberger, P., Lunn, J. E., Weber, H. (2010). Sucrose non-fermenting kinase 1 (SnRK1) coordinates metabolic and hormonal signals during pea cotyledon growth and differentiation. *Plant J*, 61(2), 324–38.
- Ramon, M., Rolland, F., Sheen, J. (2008). Sugar sensing and signaling. *The Arabidopsis Book/ASPB*, 6, e0117.
- Ramon, M., Ruelens, P., Li, Y., Sheen, J., Geuten, K., Rolland, F. (2013). The hybrid four-CBS-domain KIN betagamma-subunit functions as the canonical gamma-subunit of the energy sensor SnRK1. *Plant J*, 75, 11-25.

- Ritte, G., Lloyd, J. R., Eckermann, N., Rottmann, A., Kossmann, J., Steup, M. (2002). The starch-related R1 protein is an alpha-glucan, water dikinase. *PNAS*, 99(10), 7166-71.
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Baena-González, E. (2013). ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25(10), 3871-84.
- Rolland, F., Baena-González, E., Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 675-709.
- Rolland, F., Moore, B., & Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell*, 14 Suppl, S185–205.
- Ruiz-Gayosso, A. K. (2015). Caracterización del Dominio de Unión a Almidón (SBD) presente en a subunidad AKINβ2 del complejo SnRK1 de Arabidopsis thaliana. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Sakoda, H., Fujishiro, M., Fujio, J., Shojima, N., Ogiyama, T., Kushiyama, A., Asano, T. (2005). Glycogen debranching enzyme association with beta-subunit regulates AMP-activated protein kinase activity. *Am J Physiol Endocrinol Met*, 289(3) E474-81.
- Schluepmann, H., Berke, L., Sanchez-Perez, G. F. (2012). Metabolism control over growth: a case for trehalose-6-phosphate in plants. *J Exp Bot*, 63(9), 3379-90.
- Scott, J. W., Hawley, S. A., Green, K. A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G. A. (2004). CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest*, 113, 274-284.
- Sharff AJ, Rodseth LE, Spurlino JC, Quijcho FA (1992) Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochem*, 31, 10657-10663.
- Shen, W., Reyes, M. I., Hanley-Bowdoin, L. (2009). Arabidopsis protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop. *Plant Physiol*, 150(2) 996-1005.
- Shilton, B. H., Flocco, M. M., Nilsson, M., and Mowbray, S. L. (1996). Conformational changes in three periplasmic receptors for bacterial chemotaxis and transport: the maltose-, glucose/galactose- and ribose-binding proteins. *J Mol Biol*, 264 (2), 350-363.
- Spurlino, J.C., Lu, G. Y., Quijcho F. A. (1991). The 2.3-Å resolution structure of the maltose or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J Biol Chem*, 266, 5202-5219
- Steinberg, G. R., Kemp, B. E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev*, 89(3), 1025–78.
- Steup, M. (1981). Purification of chloroplast alpha-1,4-glucan phosphorylase from spinach leaves by chromatography on Sepharose-bound starch. *Biochim Biophys Acta*, 659(1), 123-31.
- Sugden, C., Crawford, R. M., Halford, N. G., Hardie, D. G. (1999a). Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T-loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J*, 19, 433-439.

- Sugden, C., Donahy, P. G., Halford, N. G., Hardie, D. G. (1999b). Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol.* 120(1), 257-74.
- Svensson, B., Jespersen, H., Sierks, M. R., MacGregor, E. A. (1989). Sequence homology between putative raw-starch binding domains from different starch-degrading enzymes. *Biochem J*, 264(1), 309-11.
- Svensson, B., Larsen, K., Svendsen, I., Boel, E. (1983). The complete amino acid sequence of a glycoprotein, glucoamylase G1, from *Aspergillus niger*. *Carlsberg Res Comm*, 48(6), 529-544.
- Telmer, P. G., Shilton, B. H. (2003). Insights into the conformational equilibria of maltose-binding protein by analysis of high affinity mutants. *J Biol Chem*, 278(36), 34555-34567.
- Tomme, P., Boraston, A., Kormos, J. M., Warren, R. A. J., Kilburn, D. G. (2000). Affinity electrophoresis for the identification and characterization of the soluble sugar binding by carbohydrate-binding module. *Enzyme Microbial Technol*, 27(11), 453-458.
- Trejo-Fregoso, J. R. (2015). Identificación de proteínas blanco del complejo enzimático SnRK1 de *Arabidopsis thaliana*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the Snnf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling metabolism. *Genes Dev*, 15(9), 1104-14.
- Walker, I. H., Hsieh, P., Riggs, P. D. (2010). Mutations in maltose-binding protein that alter affinity and solubility properties, 187-197.
- Weise, S. E., Weber A. P. M., Sharkey, T. D. (2004). Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta*, 218(3), 474-82.
- Wiatrowski, H. A., Van Denderen, B. J., Berkey, C. D., Kemp, B. E., Stapleton, D., Carlson, M. (2004). Mutations in the Gal83 glycogen-binding domain activate the snf1/gal83 kinase pathway by glycogen-independent mechanism. *Mol Cell Biol*, 24, 352-361.
- Wingler, A., Masclaux-Daubresse, C., Fischer, A. M. (2009). Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms. *J Exp Bot*, 60(4), 1063-6.
- Wojtaszewski, J. F., Jorgensen, S. B., Hellsten, Y., Hardie, D. G., Richter, E. A. (2002). Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-ribose on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes*, 51(2), 284-92.
- Xiao, B., Heath, R., Saiu, P., Leiper, F. C., Leone, P., Jing, C. (2007). Structural basis for the AMPK binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*, 449, 496-500.
- Xiao, B., Sanders, M. J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F. V., Carmena D. (2011). Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*, 472, 230-233.
- Xiao, S. E., Sheen, J., Jang, J. (2000). The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth development. *Plant Mol Biol*, 44, 451-461.

- Yu, T. S., Kofler, H., Häusler, R. E., Hille, D., Flügge, U. I., Zeeman, S. C., Smith, A. M., Kossmann, J., Lloyd, J., Ritte, G., Steup, M., Lue, W.-L., Chen, J., Weber, A. (2001). The Arabidopsis *sex1* mutants is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell*, 13(8), 1907-18.
- Zeeman, S. C., Kossmann, J., Smith, A. M. (2010). Starch: its metabolism, evolution and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 61, 209-34.
- Zeeman, S. C., Northrop, F., Smith, A. M., ap Rees, T. (1998). A starch-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* deficient in chloroplastic starch-hydrolysing enzyme. *Plant J*, 15(3), 357-365.
- Zeeman, S., Thorneycroft, D., Schupp, N., Chapple, A., Weck, M., Dustan, H., Haldimann, P., Bechtold, N., Smith, A. M., Smith, S. M. (2004). Plastidial alpha-glucan phosphorylase is not required for starch degradation in Arabidopsis leaves but has a role in the tolerance of abiotic stress. *Plan Physiol*, 135(2), 849-58.
- Zhang, Y. L., Guo, H., Zhang, C. S., Lin, S. Y., Yin, Z., Peng, Y., (2013). AMP as a low-energy charge signal autonomously initiates assembly of AXIN-AMPK-LKB1 complex for AMPK activation. *Cell Metab*, 18, 546-555.
- Zhang, Y., Shewry, P. R., Jones, H., Barcelo, P., Lazzeri, P. A., Halford, N. G. (2001). Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *Plant J*, 28(4), 431-41.