



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Función de cinasas tipo SnRK1 en *Arabidopsis thaliana* durante la
deficiencia de fosfato

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

SELENE FRAGOSO IÑIGUEZ

TUTOR PRINCIPAL: Dra. Martha Patricia Coello Coutiño
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Mario Rocha Sosa (†)
Instituto de Biotecnología

Dra. Estela Sánchez de Jiménez
Facultad de Química

Ciudad de México. marzo, 2020



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.

Reconocimientos

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la dirección de la Dra. Patricia Coello Coutiño en el laboratorio 104 del departamento de Bioquímica, en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Mario Rocha Sosa del Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Estela Sánchez de Jiménez de la Facultad de Química, UNAM
Dra. Patricia Coello Coutiño de la Facultad de Química, UNAM

Este trabajo fue apoyado por PAPIIT IN202206 y IN227019, PAIP 5000-9126 y CONACyT 52072 y A1-S-8674

Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de esta tesis.

Se agradece al programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP) por el financiamiento otorgado para asistencia a congresos nacionales.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día _____.

El jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Vocal	Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles
Vocal	Dra. Ma. de la Paz Sánchez Jiménez
Vocal	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Dra. Sobeida Sánchez Nieto

A mi papá

Índice

Índice de figuras y tablas	5
Abreviaturas.....	6
Resumen	8
Abstract.....	9
1 Introducción.....	11
1.1 Efectos de la deficiencia de fosfato en las plantas	11
1.2 Señalización desencadenante de las respuestas a la deficiencia de Pi	16
1.3 La familia SNF1/AMPK/SnRK1.....	17
2 Hipótesis	31
3 Objetivos.....	31
4 Materiales y métodos.....	31
4.1 Material biológico	32
4.2 Siembra y cuidado de <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
4.3 Anticuerpos contra la subunidad catalítica AKIN10 y AKIN11 (anti α).....	33
4.4 Separación de las subunidades catalíticas por electroforesis bidimensional.....	33
4.5 Experimentos con RNA.....	34
4.6 Plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i>	36
4.7 Localización subcelular de las subunidades catalíticas de SnRK1	39
4.8 Ensayo de Actividad de cinasa SnRK1	42
4.9 Marcaje con $^{14}\text{CO}_2$ y cuantificación del almidón.....	43
5 Resultados.....	44
5.1 Actividad de SnRK1 y deficiencia de Fosfato	44
5.2 Caracterización de las mutantes <i>akin10</i>	45
5.3 Localización subcelular de las subunidades catalíticas de las SnRK1	50
5.4 Efecto de la deficiencia de fosfato sobre las plantas transgénicas que sobreexpresan las subunidades catalíticas fusionadas con la GFP	54
5.6 Afectación en la expresión de otros genes durante la deficiencia de fosfato.....	57
6 Discusión	60
6.1 Efecto de la deficiencia de fosfato sobre la actividad de SnRK1	60
6.2 Localización de AKIN10 y AKIN11	63
6.3 AKIN10 participa en la degradación de Almidón	64
6.4 Las SnRK1 participan en la regulación de la expresión genética durante la deficiencia de fosfato	65
7 Conclusiones.....	67
8 Perspectivas	67
9 Bibliografía.....	68
10 Artículos	83

Índice de figuras y tablas

<i>Figura 1.</i> Algunas estrategias que presentan las plantas para contrarrestar la deficiencia de Pi.	12
<i>Figura 2</i> Adaptaciones Metabólicas durante la deficiencia de Fosfato.	15
<i>Figura 3</i> Algunas proteínas y vías metabólicas reguladas por AMPK.	19
<i>Figura 4.</i> Representación esquemática de la represión por glucosa en levadura..	20
<i>Figura 5.</i> Representación de las subunidades que conforman al complejo	23
<i>Figura 6.</i> Regulación y moléculas blanco de SnRK1.....	30
<i>Figura 7.</i> Plásmidos utilizados	37
<i>Figura 8.</i> Actividad de SnRK1	44
<i>Figura 9</i> Acumulación de los transcritos de AKIN10 y AKIN11	45
<i>Figura 10.</i> Homociguidad de la mutante de <i>akin10</i>	46
<i>Figura 11.</i> La mutante <i>akin10</i> no expresa el mensaje para AKIN10.	47
<i>Figura 12.</i> Alineamientos de los productos de PCR de <i>AKIN10</i> y <i>AKIN11</i>	47
<i>Figura 13.</i> Alineamiento de las secuencias proteicas de las subunidades catalíticas	48
<i>Figura 14.</i> La mutante <i>akin10</i> no presenta niveles detectables de la proteína	48
<i>Figura 15.</i> Efecto de la deficiencia de fosfato sobre la mutante <i>akin10</i>	49
<i>Figura 16.</i> Selección de plantas de Arabidopsis transformadas	50
<i>Figura 17.</i> Localización subcelular de las proteínas AKIN10-GFP y AKIN11-GFP.).....	51
<i>Figura 18.</i> Localización cloroplástica de las subunidades α	52
<i>Figura 19.</i> Localización de las subunidades α de las SnRK1 en hoja y raíz.	53
<i>Figura 20</i> Actividad de plantas transgénicas que sobreexpresan las subunidades catalíticas.	54
<i>Figura 21.</i> Disminución de AKIN11 durante la deficiencia de fosfato.....	55
<i>Figura 22.</i> Caracterización de AKIN10-GFP y AKIN11-GFP durante la deficiencia de Fosfato.....	56
<i>Figura 23.</i> Acumulación de almidón el tipo silvestre y la mutante <i>akin10</i>	57
<i>Figura 24.</i> Movilización de almidón	57
<i>Figura 25.</i> Expresión diferencial de genes.....	58
<i>Figura 26.</i> Genes que modifican su expresión en la mutante <i>akin10</i>	59
Tabla 1. Enzimas que forman parte de la súper familia CDPK-SnRKs de plantas.....	17
Tabla 2. Subunidades que pueden formar parte del complejo SnRK1.....	22
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados.....	35
Tabla 4. Ingredientes para hacer Percoll 80% y 40%.....	41
Tabla 5. Genes elegidos para corroborar una expresión diferencial.....	58

Abreviaturas

ABI1	proteína de insensibilidad a ácido abscísico 1
ACC	acetil-CoA carboxilasa
ADP	Adenosín difosfato
AGPasa	ADP Glucosa Pirofosforilasa
AID	Dominio de autoinhibición
AMP	Adenosín Monofosfato
AMPK	AMP Activated Kinase/ Cinasa activada por AMP
ASC	Secuencia de Interacción con el complejo SNF1
ATP	Adenosín trifosfato
CaMKs	Proteínas cinasas dependientes de Calmodulina
CBM	Carbohydrate Binding Module (Modulo de unión a Carbohidratos)
CCaMKs	Proteínas cinasas dependientes de calcio y calmodulina
CDPKs	Proteínas cinasas dependientes de calcio
CHREBP	proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
CRKs	Proteínas cinasas relacionadas con las CDPK
CTD	Domino del carboxilo terminal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EIN3	Proteína insensible a etileno 3
DPE1	Enzima desproporcionadora
DPE2	Transglucosidasa
F2,6 BP	fructosa-2,6 bifosfato
F2KP	Fosfofructocinasa 2
FUS3	factor de transcripción del dominio B3 FUSCA3
G3P	Gliceraldehído 3-fosfato
GAL1	Galactocinasa1
Gal83	Subunidad β 3 de SNF1
GFP	Green Fluorescent Protein/ Proteína verde fluorescente
GWD	Glucan agua dicinasa
HEX	Hexocinasa
HMGR	3-Hidroxi-3-Metilglutaril-CoA
IDD8	factor de transcripción de dominio indeterminado 8
INO1	factor de transcripción
KIS	Dominio de Interacción con la cinasa
Mig 1	Proteína Reguladora Mig1
mTORC1	complejo C1 del blanco de rapamicina en mamíferos
MYC2	Factor de transcripción bHLH, regulador maestro de Jasmonatos
NADP ⁺	Nicotinamida dinucleótido-fosfato forma oxidada
NADPH	Nicotinamida dinucleótido-fosfato forma reducida

NR	Nitrato reductasa
PEPRKs	Cinasas relacionadas con las PCKs
PFKFB2/3,	Isoformas cardiaca e inducible de la 6-fosfofructo-2-cinasa
PGC-1 α	PPAR- γ coactivador-1 α
Pi	Fosfato inorgánico
PP2CA	Proteína fosfatasa 2CA
PCKs	Cinasas de fosfoenolpiruvato carboxilasa
PPi	Pirofosfato
PWD	Fosfoglucan agua dicinasa
RIM	Regulatory Interaction Module/ Modulo regulador de interacción
RNA	Ácido ribonucleico
SCF	SKP1-CUL1-F-box
SIRT1	sirtuina-1
SnAK	SnRK Activated Kinases/Cinasas Activadoras de SnRKs
SNF1	Sucrose Non Fermenting 1/ Mutante no fermentador de sacarosa
SnRKs	Cinasas relacionadas a las SnF1
SPS	Sacarosa Fosfato Sintasa
SREBP1c	Proteína de unión al elemento regulador del esteroI
SUMO	Small ubiquitin-like modifier/ Proteína pequeña que modifica parecido a la ubiquitinación
T6P	Trehalosa-6-fosfato
TBC1D1,	Proteína de dominio TBC1 -1
T-DNA	TDN de Transposón
TIF-1 ^a	Factor de iniciación de la transcripción -1 ^a
TPS5	Trehalosa Fosfato sintasa
TRE1	Trealasa1
ULK1	cinasa de serina y treonina tipo Unc-51activadora de autofagia 1
Ub	Ubiquitina
WRI1	WRINKLED1

Resumen

Un tipo de estrés a los que las plantas se ven sometidas, de manera global, es la deficiencia de fosfato (Pi). Esta condición se refleja en una reducción de moléculas fosfatadas, y un déficit energético en las plantas. En mamíferos y levaduras existe un complejo heterotrimérico conocido como AMPK (AMP Activated Kinase/ Cinasa Activada por AMP) y SNF1 (Sucrose Non Fermenting/ Mutante no fermentador de sacarosa), respectivamente, que percibe la deficiencia energética y regula el metabolismo celular apagando las vías de síntesis y encendiendo las de degradación. En plantas este complejo se conoce como SnRK1 (SNF1 Related Kinases / Cinasas relacionadas con las SNF1) que también tiene la función de ser sensor energético por lo que estaría activo durante el déficit energético provocado por la deficiencia de fosfato. En este trabajo exploramos la hipótesis de que las isoformas de las subunidades catalíticas AKIN10 y AKIN11 de SnRK1 se regulan diferencialmente durante la deficiencia de Pi y participan en el metabolismo de almidón y en la regulación de la expresión genética durante este estrés nutrimental. Para probarla, se obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, que sobreexpresan las subunidades catalíticas del complejo SnRK1, AKIN10 y AKIN11 en fusión con la GFP. Además, se obtuvo una mutante nula de AKIN10 por inserción de T-DNA. Los resultados mostraron que la actividad total de SnRK1 disminuye durante la deficiencia de Pi respecto a las plantas que crecen en suficiencia nutrimental, y al analizar los transcritos de los genes que codifican para las subunidades catalíticas no se encontraron diferencias. La localización subcelular de las subunidades catalíticas de SnRK1 se observó en las plantas transgénicas que sobreexpresaban AKIN10 o AKIN11 en fusión con la GFP y resultó ser principalmente cloroplástica, aunque también se apreció en el citoplasma; la actividad de SnRK1 en las plantas transgénicas AKIN11-GFP durante la deficiencia de Pi, se redujo en alrededor del 40%, mientras que en las AKIN10-GFP, se incrementó en un 100%. No se encontraron diferencias en la actividad durante la suficiencia nutrimental respecto a plantas tipo silvestre. Estos resultados no se explican por una diferencia en el estado de activación de los complejos medida por la fosforilación de la T^{175/176} presente en el asa de activación de las subunidades catalíticas, ya que ambas subunidades estaban igualmente fosforiladas en condiciones normales o de estrés energético. Sin embargo, los análisis bioquímicos evidenciaron la degradación específica de AKIN11 durante la deficiencia de Pi. Esto sugiere que el complejo activo durante la deficiencia de Pi es el formado con la subunidad catalítica AKIN10. Desde un punto de vista metabólico, las mutantes *akin10* parecen

no movilizar todo el almidón durante la noche en condiciones de deficiencia de Pi, lo que sugiere que AKIN10 resulta importante para la degradación del almidón. Finalmente, se encontró que AKIN10 regula expresión de varios genes en respuesta a la deficiencia de Pi, por lo que tendría un papel importante en el control de la transcripción. El análisis de los resultados confirma que las isoformas AKIN10 y AKIN11 se regulan diferencialmente en respuesta a la deficiencia de Pi por lo que solamente una de ellas estaría participando en la regulación del metabolismo de almidón y de la expresión genética durante la deficiencia de fosfato.

Abstract

Plants worldwide are exposed to phosphate deficiency. This condition, in addition to the lack of phosphorylated molecules, causes an energy stress. In mammals and yeasts, a heterotrimeric complex identified as AMPK and SNF1, respectively, perceives energy deficiency and regulates the cellular metabolism by turning off the synthetic pathways and turning on catabolism. In plants this complex is recognized as SnRK1, and it has also been postulated to function as an energy sensor, which would be active during energy stress due to the lack of Pi. In this work, we explore the hypothesis that SnRK1 catalytic subunits isoforms, AKIN10 and AKIN11, are differentially regulated during Pi deficiency and participate in starch metabolism and in the regulation of genetic expression during this condition. To test it, transgenic *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing the catalytic subunits of the SnRK1 complex, AKIN10 and AKIN11, were obtained in fusion with the Green Fluorescent protein (GFP). In addition, a null mutant of AKIN10 by insertion of T-DNA, was acquired by the Arabidopsis Resource Center. The results showed that the activity of SnRK1 is diminished in wild type *Arabidopsis thaliana* during the Pi deficiency compared with plants that grow in complete nutrient solution. The analysis of the transcripts of the genes encoding for the catalytic subunits showed no differences. Subcellular localization of the catalytic subunits was found to be mainly chloroplastic, although it was also observed in the cytoplasm. The activity in the AKIN11-GFP transgenic plants during Pi deficiency, was reduced by about 40%, while in the AKIN10-GFP it was increased by 100%; no differences were found in plants growing in normal nutrient conditions. These results could not be explained due to a difference in the activation status of the complexes measured by phosphorylation of T^{175/176} present in the activation loop of the catalytic subunits,

because both subunits were equally phosphorylated. However, biochemical analysis showed the specific degradation of AKIN11 during Pi deficiency, an indicator that in this condition, the active complex is formed with AKIN10. In addition, the *akin10* mutants did not show a complete mobilization of the starch during the night, when plants were growing under Pi deficiency conditions, suggesting that AKIN10 is important for starch degradation. Finally, it was observed that AKIN10 regulates the expression of several genes in response to Pi deficiency, so it performs a significant role in the control of transcription regulation. The analysis of the results confirms that the AKIN10 and AKIN11 isoforms are differentially regulated in response to Pi deficiency, so both would be participating in the regulation of starch metabolism and genetic expression during phosphate deficiency.

1 Introducción

1.1 Efectos de la deficiencia de fosfato en las plantas

La forma más abundante de fósforo en los seres vivos es el fosfato (Pi), componente esencial de biomoléculas como ácidos nucleicos, ATP, NADPH, azúcares fosfato y fosfolípidos. Los enlaces que forma el Pi con otras moléculas son generalmente de alta energía y se pueden utilizar para mantener la maquinaria metabólica de las células. Además, el Pi puede ser tanto sustrato como producto final de muchas reacciones enzimáticas, participando así en la regulación de vías metabólicas y en la transducción de señales (Raghothama, 1999).

Las plantas toman el fósforo de la solución del suelo preferentemente en forma de ortofosfato, (H_2PO_4^-); sin embargo, debido a su alta reactividad, este se acompleja rápidamente con cationes como Al_3^+ , Ca_2^+ , o Fe_3^+ , por lo que se encuentra más frecuentemente en forma de sales precipitadas y ésteres de fosfato, que son formas no asimilables por las plantas, provocando así un estrés constante por deficiencia de Pi (Grossman y Takahashi, 2001; Lynch, 2011). Se calcula que el 30% de los suelos agrícolas del mundo son deficientes en Pi (MacDonald *et al.*, 2011)

Dada la importancia del Pi tanto en la regulación metabólica como en la síntesis de biomoléculas, los efectos de la deficiencia de este nutriente suelen ser graves. La planta puede presentar un color verde oscuro con manchas púrpuras debidas a la acumulación de antocianinas, las cuales pueden generar un efecto protector del DNA y el aparato fotosintético del daño oxidativo (Zeng, *et al.*, 2010). Además, las plantas sometidas a deficiencia de Pi presentan un menor desarrollo vegetal y de florecer o fructificar tendrán un rendimiento por debajo de los estándares de una planta en condiciones óptimas, si la deficiencia es más severa, la planta puede llegar a detener el desarrollo y dejar de reproducirse muriendo en etapas tempranas (Viola, *et al.*, 2003; Fang, *et al.*, 2009).

1.1.1 Estrategias de las plantas contra la deficiencia de Pi

1.1.1.1 Adaptaciones para favorecer la adquisición de fósforo

Las plantas han desarrollado para contrarrestar los efectos negativos del estrés por deficiencia de Pi, mecanismos que les permiten adquirir y/o utilizar el Pi de manera eficiente (figura 1). Dentro de los mecanismos que favorecen la adquisición de Pi se encuentran aquellos procesos que solubilizan el Pi inmóvil en la solución del suelo, como la secreción a la rizósfera de fosfatasas ácidas, en particular las púrpura, que hidroliza el Pi a partir de una gran variedad de ésteres monofosfato en un amplio rango de pH (Tran *et al.*, 2010). Otras secreciones importantes son las de ácidos orgánicos, que se excretan a la rizósfera, a través de una bomba de H⁺ o por acarreadores que permiten el eflujo pasivo de los ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos quelan los cationes metálicos que contribuyen a inmovilizar el Pi, aumentando la concentración de Pi libre en la solución del suelo (Richardson, 2009; Ramaekers *et al.*, 2010).

También se presentan modificaciones en la arquitectura radical que permiten aumentar la superficie de exploración y de absorción (Lynch y Brown 2001; Poirier y Bucher, 2002; Paul y Pellny, 2003), además de formar relaciones simbióticas con microorganismos que facilitan la adquisición de Pi (Smith *et al.*, 2011).

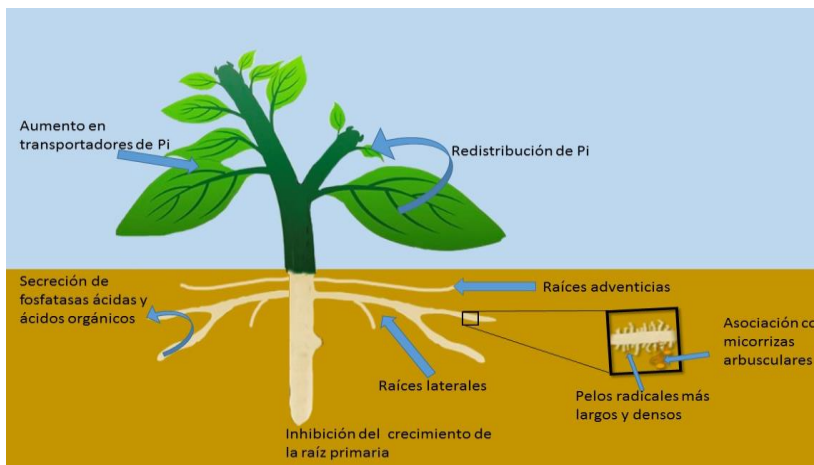


Figura 1. Algunas estrategias que presentan las plantas para contrarrestar la deficiencia de Pi Las plantas en respuesta a la deficiencia de Pi modifican, para favorecer la adquisición del Pi desde la solución del suelo, su arquitectura radical incrementando el número de raíces laterales con pelos radiculares más largos y en mayor densidad, además pueden secretar a la solución del suelo Fosfatasas y ácidos orgánicos que ayudan a solubilizar el fósforo desde el suelo. En la parte aérea, las modificaciones son tendientes a una optimización del Pi por ejemplo al redistribuirlo desde los tejidos senescentes a los que se encuentran en desarrollo, además de que se aumenta también el número de transportadores de Pi. (Imagen adaptada de Ham *et al.*, 2018).

Por otro lado, hay adaptaciones metabólicas que permiten hacer más eficiente el uso del Pi. Éstas incluyen reducción del requerimiento de Pi en los tejidos y una eficiente removilización de éste desde tejidos senescentes o improductivos hacia tejidos en crecimiento o productivos. Después de analizar una mutante nula por inserción de T-DNA del gen no codificante *At4*, que se estimula por deficiencia de Pi y que se utiliza como marcador de esta condición, se propuso que *At4* participa en la redistribución interna de Pi entre los vástagos y las raíces (Shin *et al.*, 2006) al secuestrar el micro RNA miR399. Este miRNA tiene secuencias complementarias al RNA mensajero que codifica para la enzima E2 de conjugación de ubiquitina o PHO2, de tal forma que su secuestro evita su unión a este transcrito. La ausencia de esta enzima es responsable del fenotipo *pho2* que muestra elevada acumulación de Pi en hojas; así que, *At4* es responsable de atenuar las respuestas a la deficiencia de Pi mediadas por miR399 (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007; Chiou *et al.*, 2006). La E2 conjugasa PHO2 es un componente principal en el mantenimiento de la homeostasis de Pi en *Arabidopsis*: las mutantes *pho2* cultivadas en condiciones de suficiencia nutricional mantienen continuamente inducidos genes de respuesta a la deficiencia de Pi como los transportadores de Pi, y acumulan de 3 a 5 veces más Pi en la parte aérea que las plantas silvestres (Pant *et al.*, 2008). Se ha demostrado que uno de los blancos de PHO2 es una proteína integral de membrana denominada PHO1 que está involucrada en la descarga de Pi hacia el xilema (Liu *et al.*, 2012; Hamburger *et al.*, 2002). Son blancos también de PHO2, varios transportadores de Pi de alta afinidad (PHT1) controlando su degradación (Huang, *et al.*, 2013). Resulta interesante que, durante la deficiencia de Pi, el número de transportadores de alta afinidad se incrementa favoreciendo la redistribución de este nutriente (Shin *et al.*, 2004).

1.1.1.2 Adaptaciones para disminuir la demanda de carbono

Durante la deficiencia de Pi las reservas de Pi, ADP y ATP, disminuyen notablemente. En *Brassica nigra* esta reducción alcanza niveles de 40, 4 y 10 veces menos, respectivamente (Plaxton, 2004). Por otro lado, las pozas de pirofosfato (PPi) se mantienen estables incluso durante la deficiencia del 80% del Pi (le Roux *et al.*, 2006), lo que inhibe el flujo de carbono a través de las enzimas clásicas de

la glicólisis que son dependientes de adenilatos fosfatados. Sin embargo, puesto que las plantas deben seguir produciendo esqueletos de carbono, se ha propuesto una vía alternativa de la glicólisis en la cual se ha identificado la participación de por lo menos seis enzimas que son independientes ya sea de Pi o de adenilatos fosfatados (Plaxton y Podestá, 2006, figura 2). Por ejemplo, reacciones como la de la fosfoenol piruvato fosfatasa que, sustituyendo a la piruvato cinasa, hidroliza al PEP para convertirlo en piruvato sin necesidad de ADP, liberando Pi que puede ser utilizado en otras reacciones (Duff *et al.*, 1989; Lefevre *et al.*, 1990). Otros pasos alternativos están catalizados por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP, que evita las reacciones catalizadas por la gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa independiente de NADP y la fosfoglicerato cinasa (Duff *et al.*, 1989; Theodorou y Plaxton, 1993; Plaxton y Tran 2011).

Durante el estrés por deficiencia de Pi se activan varias enzimas dependientes de P_{PPi}; por ejemplo, la UDP-Glucosa fosforilasa y la fosfofructocinasa dependiente de P_{PPi}. Esto significa que el P_{PPi} puede ser un donador de energía durante estas condiciones de estrés. El P_{PPi} es un subproducto de varias reacciones anabólicas, y debido a que las plantas carecen de pirofosfatasa citosólica se mantiene una concentración entre 0.2 y 0.5 mM en el citosol (Ciereszko *et al.*, 2001; Plaxton y Podestá, 2006; Gutiérrez-Luna *et al.*, 2018).

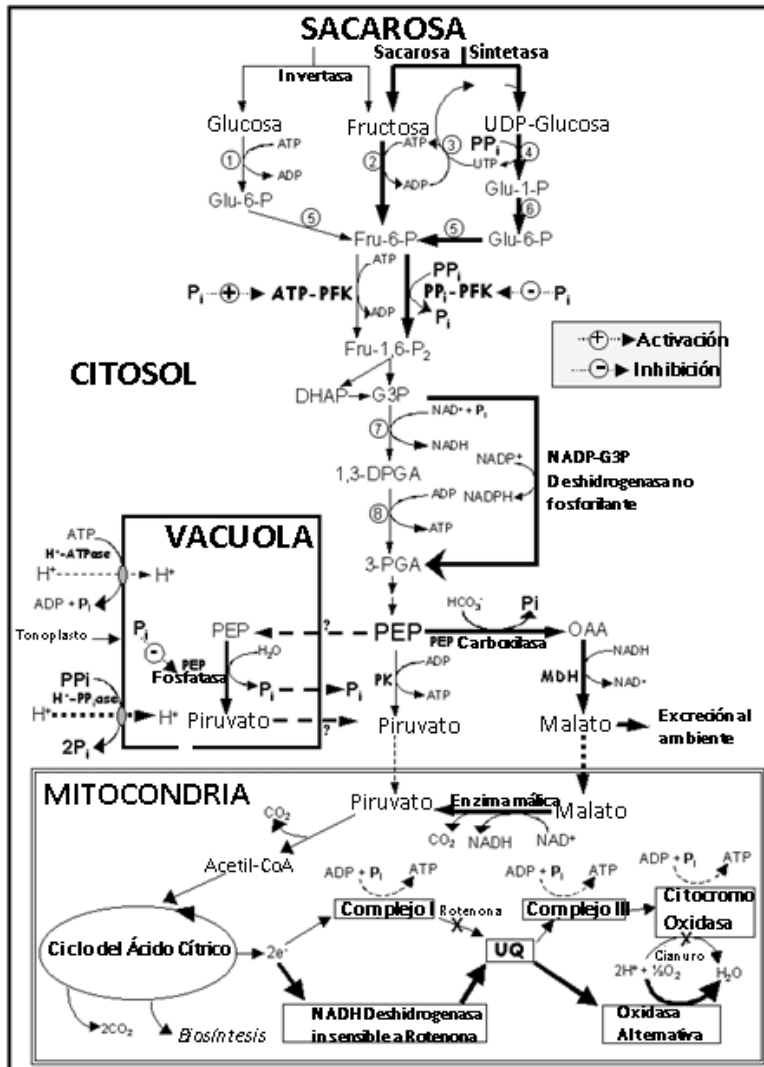


Figura 2 Adaptaciones Metabólicas durante la deficiencia de Fosfato. (adaptada de: Plaxton y Tran, 2011). Se muestra con flechas negras y gruesas las vías alternativas de la glicólisis transporte de electrones mitocondrial y bomba de protones en tonoplasto, para favorecer la respiración y el mantenimiento del pH vacuolar durante la deficiencia de fosfato.

- 1) Hexocinasa
- 2) Fructocinasa
- 3) Nucleosido difosfato cinasa
- 4) UDP-glucosa pirofosforilasa
- 5) Fosfoglucomutasa
- 6) Fosfoglucomutasa
- 7) G3P deshidrogenasa dependiente de NAD⁺
- 8) 3-fosfoglicerato cinasa.

1.2 Señalización desencadenante de las respuestas a la deficiencia de Pi en plantas

Las adaptaciones morfológicas y metabólicas permiten a las plantas sobrellevar la deficiencia de Pi y lograr mantener aquellos procesos claves para su desarrollo y supervivencia; sin embargo, no se conoce la vía de transducción de señales que desencadena estos mecanismos.

Una de las aproximaciones para intentar conocer las señales que desencadenan las respuestas a la deficiencia de fósforo fue analizar la expresión génica. Al hacerlo se encontró que dicha expresión se altera y se pudieron observar genes que responden rápidamente, desde minutos hasta unas pocas horas, pero también existen genes cuya expresión se modifica días después de la condición de deficiencia. En frijol (*Phaseolus vulgaris*) se identificaron varios genes de respuesta temprana y tardía que tienen funciones relacionadas con la señalización desencadenante de las respuestas a la deficiencia de Pi (Camacho *et al.*, 2008). Uno de los genes de respuesta tardía es *PvAKIN10* (*SnRK1 α 1*) (datos no publicados) el cual presenta una alta homología con el gen que codifica para la subunidad catalítica alfa de SnRK1, una cinasa de proteínas que pertenece a la superfamilia CDPK-SnRKs de cinasas de serina- treonina de plantas (Tabla 1; Hrabak *et al.*, 2003).

Las cinasas de serina-treonina en plantas tienen la función general de detectar y señalar los cambios medioambientales que afectan el crecimiento y desarrollo normal (Stone y Walker, 1995). Hay una gran variedad de cinasas de proteínas, algunas son comunes a todos los eucariontes como las MAP cinasas (Rodríguez *et al.*, 2010) y otras son específicas de plantas como las SnRKs las cuales pueden a su vez subdividirse, considerando la similitud en la secuencia y la estructura de los dominios, en SnRK1, SnRK2 y SnRK3, todas involucradas en la respuesta a diversos estreses abióticos, aunque solo a las SnRK1 se les reconoce la función de mantener la homeostasis energética celular (Haldford y Hardie 1998; Kulik *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2017).

Las SnRK1 son ortólogas de las SNF1 (Sucrose Non Fermenting 1) de levaduras y de las AMPK (AMP Activated Kinases) de mamíferos, que son cinasas de proteínas formadas por una subunidad catalítica y dos reguladoras que responden a deficiencia energética ya sea por la falta de glucosa o por la disminución en el contenido de ATP, respectivamente. A estos tres complejos heterotriméricos se les engloba en una familia conocida como SNF1/AMPK/SnRK1 (Alderson *et al.*, 1991; Thelander, *et al.*, 2004; Emanuelle *et al.*, 2015).

Tabla 1. Enzimas que forman parte de la súper familia CDPK-SnRKs de plantas.

Familia		Función
CDPKs	Proteínas cinasas dependientes de calcio	Sensoras de Ca^{2+} , participan en la señalización en respuesta a varios factores ambientales como inmunidad y estreses por sequía o salinidad (Boudsocq y Sheen, 2013).
CRKs	Proteínas cinasas relacionadas con las CDPK	Son específicas de plantas y se han asociado con la regulación del crecimiento radical y la respuesta gravitrópica en raíces e hipocótilos (Baba <i>et al.</i> , 2018)
PPCKs	Cinasas de fosfoenolpiruvato carboxilasa	Son específicas de plantas con metabolismo CAM, fosforilan la PPC durante la noche para optimizar la fijación de CO_2 (Boxal <i>et al.</i> , 2017) son un punto de control temporal/circadiano (Hartwell <i>et al.</i> , 2016).
PEPRKs	Cinasas relacionadas con las PPCKs	No se ha descrito aún
CaMKs	Proteínas cinasas dependientes de Calmodulina	
CCaMKs	Proteínas cinasas dependientes de calcio y calmodulina	
SnRKs	Cinasas relacionadas a las SnF1	Se subdividen en SnRK1 SNRK2 y SnRK3, estos últimos son exclusivos de plantas. Las SnRK1 participan en la regulación del metabolismo y en la señalización en respuesta a diversos estreses (Coello <i>et al.</i> , 2011, Broeckx <i>et al.</i> , 2016) Las SnRK2 participan en la regulación del estrés osmótico y en las respuestas a ABA (Shinozawa <i>et al.</i> , 2019). Las SnRK3 están involucradas en la tolerancia la salinidad (Coello <i>et al.</i> , 2011; Wu <i>et al.</i> , 2017).

1.3 La familia SNF1/AMPK/SnRK1

Estas cinasas están conservadas en eucariontes y se ha demostrado que tienen la función de percibir los niveles de energía en la célula activando los mecanismos necesarios para que los organismos puedan mantener la homeostasis. Son complejos heterotriméricos formados por una subunidad catalítica α , y dos reguladoras β y γ , que están ampliamente conservadas entre los diferentes organismos que se han estudiado, aunque las SnRK1 de plantas presentan variaciones específicas.

En esta sección se revisarán por separado cada uno de los diferentes complejos comenzando con la AMPK de mamíferos, después por la SNF1 de levaduras y posteriormente se abordará a las SnRK1 de plantas.

1.3.1 La AMPK de mamíferos

La AMP Activated Kinase (AMPK, por sus siglas en inglés), fue la primer enzima de esta familia en ser descrita. Si bien se purificó y secuenció en 1994, inicialmente se asoció a la regulación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) (Carlson *et al.*, 1973) y de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) (Beg *et al.*, 1973). Además, se demostró que la actividad de la ACC era modulada por 5'-AMP. Al principio se pensó que la cinasa que regulaba a estas enzimas metabólicas era diferente, pero, en 1987, el grupo de Hardie aclaró que eran actividades de una misma enzima que se nombró cinasa activada por AMP (AMPK) (Carling *et al.*, 1987; Davies *et al.*, 1994; Steinberg y Kemp, 2009; Hardie y Alessi, 2013).

La AMPK es regulada por AMP a través de un triple mecanismo 1) la unión de AMP (y de ADP) promueve la fosforilación de la T¹⁷² por la cinasa activadora LKB1 (una de las dos enzimas activadoras, la otra es la CaMKK β , que puede fosforilar y activar la AMPK) 2) La unión de AMP inhibe la desfosforilación de dicho residuo y 3) la unión del AMP causa la activación alostérica del complejo, estos efectos del AMP son antagonizados por la unión de ATP (Gowans y Hardie, 2014). La AMPK es activada en respuesta a situaciones que dan lugar a un aumento en la relación AMP/ATP, es decir en situaciones donde la degradación del ATP aumenta por el alto consumo energético, un ejemplo de esta condición es el ejercicio y la isquemia, por lo que se considera al complejo como un sensor del contenido energético que permite a la célula adaptar el metabolismo para mantener la homeostasis. Lo anterior se logra al inhibir vías biosintéticas que gastan ATP mientras se estimulan aquellas que lo producen. En el momento en el que los niveles de ATP vuelven a ser altos, la AMPK se inactiva, lo que favorece las vías biosintéticas, todo esto a través de la fosforilación directa de sus múltiples sustratos que pueden ser enzimas participantes en diversas vías metabólicas o bien factores de transcripción (figura 3) (Hardie, 2006; Hardie y Alessi, 2013).

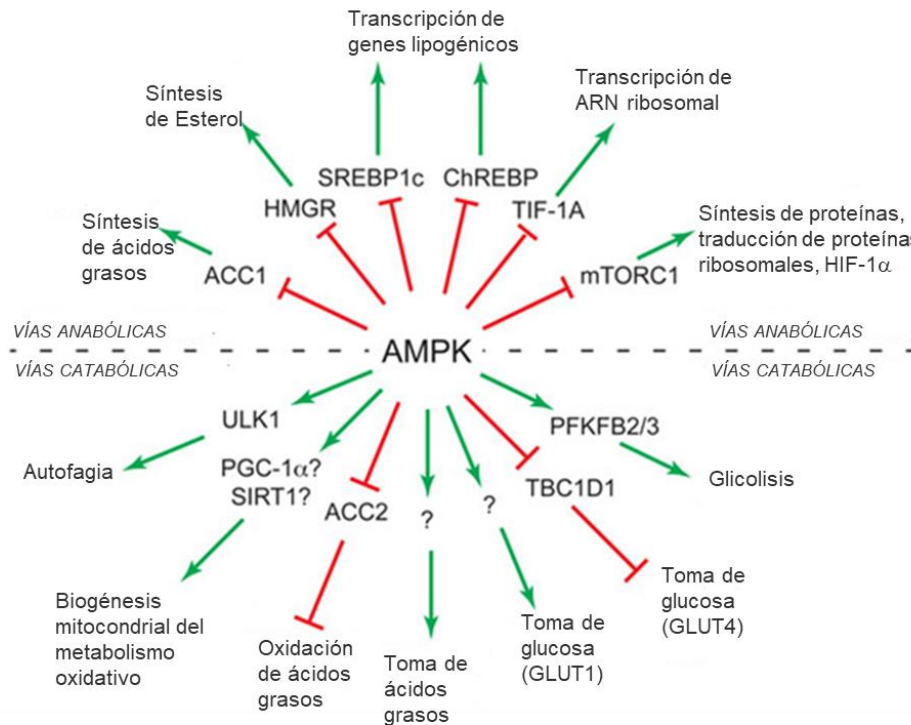


Figura 3 Algunas proteínas y vías metabólicas reguladas por AMPK. Las vías anabólicas apagadas por AMPK se muestran en la mitad superior de la imagen, mientras que las vías catabólicas encendidas se muestran en la mitad inferior. En el círculo interno están las proteínas blancas conocidas. Cuando éstas se activan por fosforilación se muestra una flecha verde y una flecha roja sin punta indica cuando se inactivan. Un signo de interrogación indica que no se sabe con certeza si la proteína se fosforila directamente por AMPK, o por el intermediario en la vía. Abreviaciones ACC1/ACC2, acetil.-CoA carboxilasas-1/-2; HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; SREBP1c, proteína de unión al elemento regulador del esteroles; CHREBP, proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos; TIF-1A, factor de iniciación de la transcripción -1A; mTORC1, complejo C1 del blanco de rapamicina en mamíferos; PFKFB2/3, 6-fosfofructo-2-cinasa, isoformas cardiaca e inducible; TBC1D1, proteína de dominio TBC1 -1; SIRT1, sirtuina-1; PGC-1 α , PPAR- γ coactivador-1 α ; ULK1, cinasa de serina y treonina tipo Unc-51activadora de autofagia 1 (Tomado y traducido de Hardie y Alessi, 2013).

La AMPK funciona como un complejo heterotrimérico y para cada una de las subunidades que lo conforman existen varias isoformas, dos isoformas de la subunidad catalítica α ($\alpha 1$ y $\alpha 2$), tres de la subunidad de andamiaje β ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$) y tres de la subunidad reguladora γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$ y $\gamma 3$). Todas estas isoformas pueden formar parte del complejo activo lo que significa al menos 12 posibles combinaciones distintas lo cual en parte explica que la AMPK responda a tejidos y contextos específicos (Cao *et al.*, 2017). No se ha demostrado la existencia de algún complejo predominante, pero la localización de las diferentes subunidades favorece la presencia de algunos, por ejemplo, la expresión de $\alpha 1$ parece ser ubicua en todo el organismo, aunque su localización subcelular es citoplásmica; por otro lado, la localización de $\alpha 2$ se restringe al corazón, músculo e hígado tanto en

el núcleo como en el citoplasma, la formación de los diferentes complejos podría estar determinando cierto grado de especificidad (Mahlapuu *et al.*, 2004; Herzig y Shaw, 2018).

1.3.2 La SNF1 de levadura

La levadura (*Saccharomyces cereviceae*) utiliza como fuente preferida de energía preferida la glucosa, sin embargo, en condiciones limitantes de este nutrimento, adapta su metabolismo para utilizar otras fuentes de carbono como sacarosa e incluso etanol. Esto se logra a través de la combinación de dos mecanismos principalmente, la inducción y la represión por glucosa (Rolland F, *et al.*, 2002). En presencia de glucosa, varios genes que codifican para proteínas que permiten el uso de otros carbohidratos, permanecen reprimidos transcripcionalmente; esta represión se da por la acción de la proteína Mig1 que, en presencia de glucosa, se une a los promotores de los genes blanco. En ausencia de glucosa, Mig1 se fosforila y se transloca rápidamente al citoplasma, liberando a los genes blanco de la represión, permitiendo así la utilización de fuentes alternas de carbono (figura 4; De Vit *et al.*, 1997; Coccetti, *et al.*, 2018).

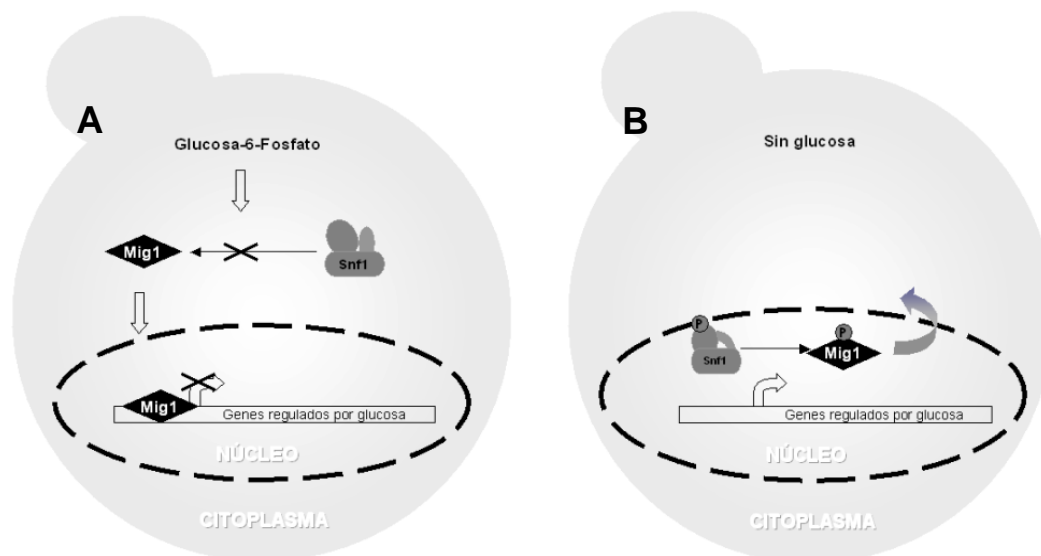


Figura 4. Representación esquemática de la represión por glucosa en levadura. (A) En presencia de glucosa, Mig1 entra al núcleo donde se une a los promotores de los genes reprimidos por glucosa impidiendo su transcripción. (B) En ausencia de glucosa, el complejo SNF1 fosforila a Mig1 y con ello se exporta del núcleo favoreciendo la expresión de los genes reprimidos por glucosa.

El complejo proteico responsable de la fosforilación de Mig1 es SNF1, que recibió este nombre porque la mutante *Δsnf1* (por sus siglas en inglés Sucrose Non Fermenting 1) es incapaz de crecer en ausencia de glucosa. SNF1 regula la transcripción de más de cuatrocientos genes durante condiciones de deficiencia de glucosa, ejerciendo su efecto a través de fosforilar represores, como es el caso de Mig1, o activadores transcripcionales como Sip4, que favorece la gluconeogénesis e incluso la remodelación de la cromatina. La SNF1 inhibe la biosíntesis de ácidos grasos al fosforilar a la acetil-CoA-carboxilasa (ACC) durante deficiencia de glucosa, esta fosforilación también inhibe el factor de transcripción INO1 clave en la biosíntesis de fosfolípidos. ACC es necesaria para la esporulación, la acumulación de glucógeno y la biogénesis de peroxisomas; lo cual involucra a blancos de SNF1, y hacen así evidente su papel central en la regulación del metabolismo en levadura (Halford y Hardie, 1998; Hedbacker y Carlson 2008, Coccetti et al., 2018).

En cuanto a su estequiometría, el complejo puede estar conformado por una subunidad catalítica α (Snf1), tres regulatorias β (SIP1/SIP2/GAL83) y una γ (Snf4). Las subunidades β tienen un papel preponderante en la especificidad de reconocimiento de sus proteínas blanco y en la localización subcelular del complejo. Por su parte Snf4 es esencial para la activación de Snf1 y para la localización del complejo (Jiang y Carlson, 1997; Vincent *et al.*, 2001; Sanz *et al.*, 2016).

1.3.3 Las SnRK1 de plantas

1.3.3.1 Estructura

Al igual que sus homólogos AMPK y SNF1, las SnRK1 funcionan como un complejo formado por tres subunidades diferentes. En el genoma de *Arabidopsis*, existen tres genes codificantes para la subunidad α (tabla2), conocidos como *AKIN10*, *AKIN11* y *AKIN12*. Tanto *AKIN10* como *AKIN11* complementan la mutante nula *snf1* en levadura (Alderson *et al.*, 1991) mientras que en un principio se pensó que *AKIN12* era un pseudogen ya que no se encontró que se expresara (Habrak *et al.*, 2003, Baena-González *et al.*, 2007) sin embargo, existen ortólogos de este gen en otras crucíferáceas (Broeckx *et al.*, 2016) y su expresión es muy baja y limitada a polen y semilla (Shmid *et al.*, 2005; Le *et al.*, 2011).

Para las subunidades reguladoras del complejo, existen proteínas que son estructuralmente idénticas a sus contrapartes en humanos y levaduras. En el caso de las subunidades beta existen dos, AKIN β 1 y AKIN β 2, y de la subunidad gamma, existe solo una, AKIN γ . Además de estas subunidades, se presentan dos que estructuralmente difieren de las canónicas pero que se ha mostrado que pueden formar parte de los complejos activos, la AKIN β 3 y la AKIN β γ (Maya-Bernal *et al.*, 2017). En la figura 5 se muestra un resumen de las diferentes subunidades que conforman los complejos en *Arabidopsis* y en la Tabla 2 los diferentes nombres que reciben estas subunidades.

Tabla 2. Subunidades que pueden formar parte del complejo SnRK1 y los diferentes nombres que reciben en la literatura. La primer columna muestra la nomenclatura utilizada en este trabajo, la segunda el código del locus AGI correspondiente, la tercera el nombre que se utiliza actualmente, y la cuarta y la quinta, nomenclaturas utilizadas en diversos trabajos. (Modificada de Broeckx *et al.*, 2016).

<i>Subunidad</i>	<i>Locus AGI</i>	<i>Nomenclatura actual</i>	<i>Otros nombres</i>	
AKIN10	At3g01090	AtSnRK1 α 1	KIN10	SnRK1.1
AKIN11	At3g29160	AtSnRK1 α 2	KIN11	SnRK1.2
AKIN12	At5g39440	AtSnRK1 α 3	KIN12	SnRK1.3
AKINβ1	At5g21170	AtSnRK1 β 1	KIN β 1	
AKINβ2	At4g16360	AtSnRK1 β 2	KIN β 2	
AKINβ3	At2g28060	AtSnRK1 β 3	KIN β 3	
AKIN$\beta$$\gamma$	At1g09020	AtSnRK1 β γ	KIN β γ	

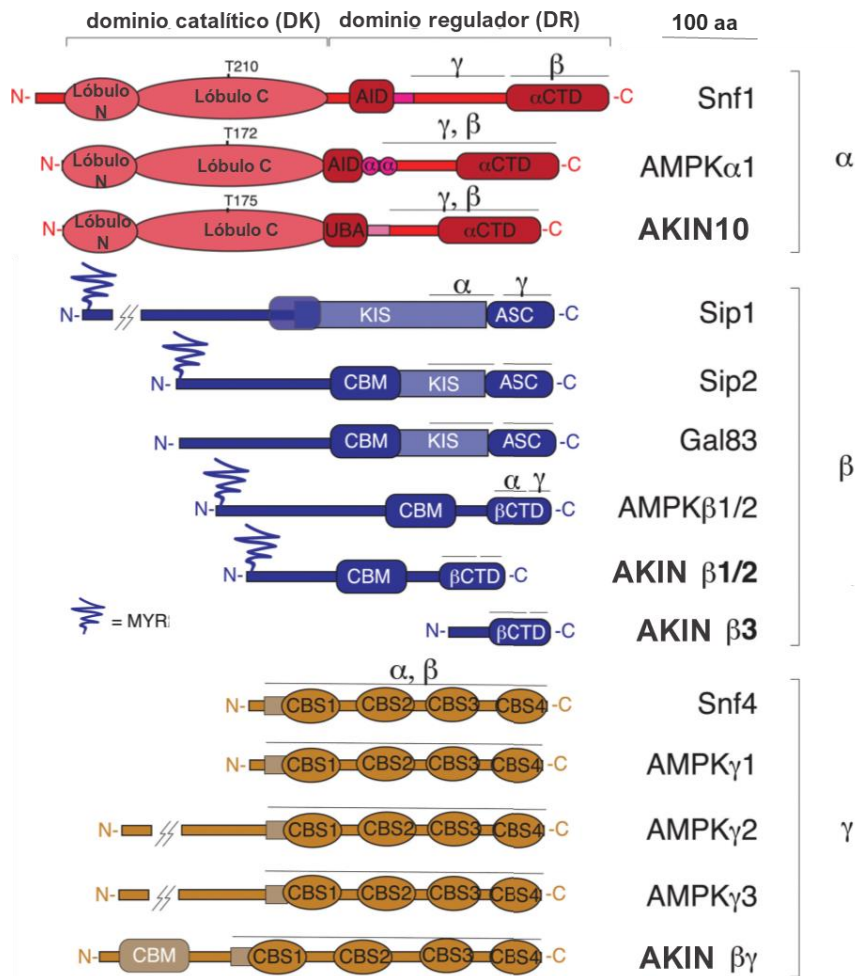


Figura 5. Representación esquemática de las subunidades que conforman al complejo SNF1/AMPK/SnrK1. Se muestra a escala la composición de dominios de los diferentes tipos de subunidades en levadura (SNF1), mamíferos (AMPK) y plantas (AKIN). Las subunidades α consisten en un dominio catalítico (cinasa) y otro regulador, la hendidura catalítica se muestra como la unión entre los lóbulos N y C del extremo amino, que también contiene el lazo de activación en donde se muestra la treonina conservada que se fosforila para la activación de la cinasa. El dominio regulador es de autoinhibición (AID) en AMPK α y Snf1 mientras que en AKIN10 se muestra el correspondiente dominio de asociación a la ubiquitina, una región de enlace conecta estos dominios con el del carboxilo terminal (α CTD) que participa en las interacciones del complejo y con otras proteínas. En AMPK, la región de enlace contiene dos motivos de interacción con las subunidades reguladoras indicados por α (α RIMI y α RIMII). Las líneas sobre los dominios representan las regiones requeridas para la interacción con las subunidades indicadas. Las subunidades β , típicamente contienen una región amino terminal variable que es miristoilada, (MYR) en la glicina 2 de la subunidad, excepto Gal 83 y AKIN β 3, un módulo central de unión a carbohidratos (CBM) (no conservado en Sip1 y ausente en la truncada AKIN β γ) y un dominio carboxilo terminal (β CTD), en levadura hay una secuencia de interacción con la cinasa (KIS) y una de asociación con el complejo SNF1 (ASC), que fueron descritos como suficientes para interactuar con la subunidad α y la β respectivamente. Las subunidades γ tiene cuatro dominios Cistation Beta Sintetasa (CBS) y una región pre-CBS necesaria para la formación del complejo, las plantas codifican una subunidad β γ híbrida (AKIN β γ) que en adición a la estructura conservada de las β , presenta un dominio CBM. (Adaptado de Broeckx *et al.*, 2016).

1.3.3.1.1 Subunidad α de las SnRK1

La subunidad catalítica de las SnRK1 está constituida por dos dominios, uno con la actividad de cinasa (DK) y un dominio autorregulador (DR). El DK se localiza en el extremo amino-terminal y tiene la estructura bilobulada convencional de las cinasas de serina-treonina que contiene al residuo de treonina conservado que se fosforila para la activación de la enzima (T^{183/172} en AMPK α 1 y α 2, T²¹⁰ en Snf1 y T^{175/176} en AKIN10/AKIN11) en la hendidura formada en la unión de ambos lóbulos, región conocida como el asa de activación o *T-loop*, (Hawley, et al. 1996; Rudolph *et al.*, 2005; Nayak, et al. 2006; Hardie, 2007). La región carboxilo-terminal, aunque conservada en la familia AMPK/Snf1/SnRK1, contiene una secuencia auto inhibitoria (AID, “autoinhibitory domain”) que reprime la actividad cinasa en mamíferos y levaduras (Pang *et al.*, 2007), mientras que en SnRK1 esta secuencia presenta similitud con la de los dominios de asociación a ubiquitina (UBA) por lo que se ha propuesto pudiera mediar la interacción con proteínas ubiquitinadas (Farrás *et al.*, 2001; Jaleel et al. 2006; Shen *et al.*, 2009). La actividad del dominio catalítico es más alta que la de la enzima completa, sugiriendo también un papel regulador de la actividad (Maya-Bernal *et al.*, 2017). El resto de secuencia (α CTD, C-terminal domain), también conocida como dominio de interacción de la cinasa (KIS, kinase interacting sequence) se requiere para la formación del complejo con las subunidades reguladoras y con las fosfatasa río arriba (Emanuelle *et al.*, 2015; Broeckx et., 2016).

1.3.3.1.2 Subunidad β de las SnRK1

La subunidad β está constituida por tres dominios: 1) hacia el amino terminal un dominio de unión a carbohidratos (CBM, Carbohydrate Binding Motif, también llamado Glycogen Binding Domain, GBD o Starch Binding Domain, SBD) que en mamíferos y levaduras puede unir glucógeno *in vitro*, lo que refuerza el papel que se le ha asignado al complejo como detector de los niveles de energía, en este caso en forma de carbohidratos (McBride *et al.*, 2009); 2) un dominio de interacción con la subunidad catalítica (KIS, Kinase Interacting Sequence) y 3) hacia el carboxilo terminal un dominio de asociación al complejo ASC (Association with the complex) conocido también como β CTD en mamíferos y plantas. Mediante el dominio KIS la subunidad beta se une a la subunidad catalítica y con el ASC a la subunidad γ , por lo que esta subunidad constituye el andamio del complejo. Ésta parece ser la función principal de la subunidad β , puesto que la subunidad AKIN β 3, que sólo contiene la secuencia ASC, es capaz de complementar la mutante nula en levadura de la subunidad

β (Δ Sip1 Δ Sip2 Δ Gal83) y se ha demostrado que puede interactuar con AKIN11, AKIN 10 y con AKIN $\beta\gamma$, pero no con AKIN β 1/ β 2 o AKIN γ (Gissot *et al.*, 2004, Gissot *et al.*, 2006). Las subunidades β también participan en la localización del complejo. En plantas se ha demostrado que las subunidades tipo β pueden regular la localización subcelular de los complejos *in vivo*. Diferentes técnicas han sugerido la presencia de este tipo de subunidades en el cloroplasto, en el núcleo y asociadas a membrana a través de una modificación lipídica, en particular la miristoilación (Wang *et al.*, 2019).

La miristoilación de la glicina 2 es también una característica conservada en las subunidades β , excepto por β 3. Esta modificación postranscripcional parece actuar también sobre la localización del complejo, favoreciendo que se encuentre en la membrana según demostró el grupo de Pierre *et al.*, en el 2007. Estos investigadores sustituyeron la glicina 2 por alanina en las subunidades β de SnRK1, AKIN β 1 y AKIN β 2, y las fusionaron a la GFP; los resultados mostraron que las proteínas incapaces de ser miristoiladas se localizaban en el citoplasma, y la actividad de SnRK1 aumentaba.

1.3.3.1.3 Subunidad gamma de las SnRK1

La subunidad γ está formada por cuatro motivos CBS (cystathionine beta synthase), los cuales forman dominios Bateman (Bateman, 1997), que pueden unir compuestos que contengan adenosina, como AMP, ADP, ATP o S-Adenosilmetionina, lo que sugiere que es esta subunidad la que monitorea el contenido celular de ATP y AMP en las células (Scott *et al.*, 2004). La subunidad γ contiene además una secuencia pseudosustrato, la cual mantiene bloqueado el sitio activo de la subunidad α , hasta que la unión del AMP produce un cambio estructural que favorece la activación, aunque esto no ha sido demostrado en levaduras o plantas (Scott *et al.*, 2007).

A pesar de que AKIN γ (plantas) es estructuralmente similar a AMPK γ (mamíferos), no se ha demostrado que pueda complementar la mutante de levadura deficiente de γ Δ snf4 ni que interactúe con las subunidades alfa o beta como si lo hace AMPK γ . Sin embargo en *Arabidopsis* existe una subunidad γ atípica denominada AKIN $\beta\gamma$ que contiene el dominio de unión a carbohidratos en el extremo amino terminal (Fordham-Skelton *et al.*, 2002) y los dominios Bateman característicos de las subunidades γ , esta subunidad sí complementa la mutante Δ snf4 y es capaz de formar complejos con AKIN10, AKIN11, lo que abre la posibilidad de que existan complejos

diméricos formados entre cualquiera de las dos subunidades catalíticas y AKIN $\beta\gamma$ (Kleinow *et al.*, 2000; Lumbreras *et al.*, 2001; Ramon *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha documentado que AKIN $\beta\gamma$ también interactúa con las subunidades β ya que se han encontrado complejos formados con AKIN10/11, AKIN $\beta\gamma$ y AKIN $\beta 3$ (Gissot *et al.*, 2006; Emanuelle, 2015; Maya-Bernal, *et al.*, 2017). Esta subunidad atípica fue estudiada por Ávila *et al.* (2014) quienes descubrieron que puede unir *in vitro* almidón obtenido de hojas y observaron que su localización es cloroplástica y propusieron que la localización cloroplástica de la subunidad podría conferir un papel preponderante en los mecanismos de regulación en plantas al unir directamente carbohidratos en este organelo. En un trabajo reciente, Ruiz-Gayosso y colaboradores (2018) encontraron, mediante microscopía electrónica, que todas las subunidades estaban presentes en el cloroplasto y además se pudo confirmar que tanto AKIN $\beta\gamma$ como AKIN $\beta 3$ unen almidón.

1.3.3.2 Algunos mecanismos de regulación post-traducciona l de las SnRK1

1.3.3.2.1 Fosforilación reversible

Como sucede con AMPK y SNF1, las SnRK1 requieren de la fosforilación en un residuo conservado de treonina (T¹⁷⁵ en AKIN10 y T¹⁷⁶ en AKIN11) para ser activas. El sitio de fosforilación está tan conservado, que se pueden utilizar los anticuerpos anti fosfo-AMPK para reconocer cualquiera de las subunidades alfa de la familia AMPK/SNF1/SnRK1 cuando están fosforiladas (Shen *et al.*, 2009; Emanuelle *et al.*, 2015). Sin embargo, el estado de fosforilación del asa de activación (*T-loop*) en SnRK1, no afecta la expresión de los genes regulados por ellas ni en cultivos celulares, ni en extractos de hoja (Baena-González *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2013). Además, el estado de fosforilación no se altera, aunque la actividad de SnRK1 sí varíe en respuesta a diferentes tratamientos (Coello, *et al.* 2012, Fragoso *et al.*, 2009).

Las cinasas activadoras SnAK1/2, identificadas como GRIK1 y GRIK2 fosforilan a las SnRK1 aumentando su actividad (Shen *et al.*, 2009; Glab *et al.*, 2017). Al igual que la LKB1 (proteína que mayoritariamente fosforila a AMPK α , las SnAK pueden autofosforilarse en el residuo T¹⁵⁴ por lo que podrían estar permanentemente activas (Shen *et al.*, 2009). Crozet *et al.* (2010) demostró que hay una fosforilación cruzada de SnRK1 sobre SnAK1/2 en el residuo S^{260/261} que inactiva a esta última.

Aunque esto sólo se observó *in vitro*, existe la posibilidad de que un mecanismo de este tipo se dé *in planta*. Resulta evidente que la defosforilación es un paso clave en la inactivación del complejo, y se han identificado dos fosfatasa que pueden defosforilar e inactivar SnRK1 *in vitro*. Una de ellas es la proteína de insensibilidad a ácido abscísico 1 (ABI1) y la proteína fosfatasa 2CA (PP2CA) (Rodríguez *et al.*, 2013). Aunque los resultados de defosforilación con la AKIN10 inmunoprecipitada son bastante claros, los heterotrímeros recombinantes del complejo son resistentes a la defosforilación por la PP2C de mamíferos, por lo que es posible que exista un factor extra, aún no identificado, que funcione como mediador de la defosforilación (Emanuelle *et al.*, 2015).

1.3.3.2.2 Activación por deficiencia energética

A las SnRK1 se les confiere un papel central en el metabolismo en respuesta a la deficiencia energética (Baena-González *et al.*, 2007; Nukarinem, 2016; Wurzinger *et al.*, 2018). La deficiencia energética puede deberse a muy diversas razones y puede medirse de diferentes formas, por ejemplo, en mamíferos la AMPK se activa por un aumento en los niveles de AMP, específicamente es sensible a la relación AMP/ADP. En este sentido, todas las condiciones que disminuyan el contenido de ATP disponible en la célula conducen a la activación del complejo, como sucede durante el ejercicio o la anoxia (Herzig y Shaw, 2018).

A diferencia de lo que sucede con AMPK, la SNF1 se regula alostéricamente por AMP, por lo menos *in vitro*; sin embargo, se ha correlacionado su activación con el incremento en la relación AMP/ATP celular (Hong y Carlson, 2008). Además, se ha demostrado que la unión de ADP a la subunidad reguladora gamma, inhibe la defosforilación de la T²¹⁰ (Shashkova *et al.*, 2015).

En plantas, no existe evidencia que indique que el AMP, el ADP o el ATP funcionen como reguladores alostéricos de la SnRK1, pero sí se ha observado que el AMP y el ADP inhiben la defosforilación del complejo (Sugden *et al.*, 1999; Maya-Bernal *et al.*, 2017). Respecto al papel de los azúcares, se ha observado que la glucosa inhibe la actividad de las SnRK1 *in vivo* al observar una disminución en la expresión de los genes marcadores de AKIN10 y en el caso de la trehalosa-6-fosfato (T6P) se ha documentado que inhibe *in vitro* la actividad catalítica de las SnRK1 a concentraciones fisiológicas (Zhang *et al.*, 2009). También se ha reportado evidencia indirecta de que esto sucede durante el desarrollo del grano de trigo (Martínez-Barajas *et al.*, 2011) y del tubérculo en papa (Debast *et al.*, 2011). El efecto inhibitorio parece limitarse a tejidos en desarrollo y estar asociado a un factor

aparentemente proteico, dada su labilidad, que se pierde en tejidos maduros; la identidad de este factor ha sido difícil de dilucidar debido a la restricción desarrollo-temporal que se presenta (O'Hara *et al.*, 2012). Estos hechos han llevado a postular que los principales organelos en percibir la deficiencia energética serían los cloroplastos y las mitocondrias ya que, al disminuir la transferencia de electrones en ambos, se aumentaría el índice AMP/ATP en la célula, además de que es en los cloroplastos en donde se producen y almacenan los azúcares que reprimen la acción de las SnRK1 (Wurzinger *et al.*, 2018).

1.3.3.3 Función

Desde su descubrimiento, se han identificado diferentes blancos de las SnRK1. Se sabe que son capaces de fosforilar e inactivar a la HMG-CoA reductasa, a la sacarosa fosfato sintasa (SPS) y a la nitrato reductasa (NR) participando así en la síntesis de isoprenoides y de sacarosa, y en la asimilación del nitrógeno (Sudgen *et al.*, 1999; Hey *et al.*, 2006; Polge *et al.*, 2008; Nukarinen *et al.*, 2016). También fosforilan e inactivan a la trehalosa fosfato sintasa (TPS5) (Harthill *et al.*, 2006) y a la 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa (Fructosa-2,6 F2KP) (Cho *et al.*, 2016; Robertlee *et al.*, 2017). Estas enzimas son necesarias para la síntesis de trehalosa-6-fosfato (T6P) y la regulación del contenido de fructosa-2,6 bifosfato (F2BP). La T6P actúa como un regulador global del metabolismo y de la transcripción, promoviendo el crecimiento y el desarrollo en respuesta a la disponibilidad de azúcares (Tsai y Gazzarrini., 2014); en tanto que la F2,6BF es un metabolito de señalización involucrado en regular la distribución de fotosintatos y la glicólisis (Nielsen *et al.*, 2004). Estos blancos hacen pensar que la SnRK1 estaría involucrada en el metabolismo de carbono, nitrógeno y lípidos en las plantas (Fig. 6).

Las SnRK1 también fosforilan factores de transcripción, participando así en la regulación de varias vías metabólicas en plantas. Por ejemplo, al fosforilar el factor de transcripción de dominio indeterminado 8 (IDD8) que regula la floración al modular el transporte y el metabolismo de azúcares, reduce su habilidad de activador transcripcional, pero no afecta su localización subcelular ni su capacidad de unirse al DNA (Wurzinger *et al.*, 2018). El factor de transcripción bZIP63 después de ser fosforilado por AKIN10/AKIN11 se homo- o heterodimeriza y puede actuar sobre sus genes blanco durante el estrés por deficiencia energética derivada de un periodo de oscuridad prolongado

(Mair *et al.*, en 2015). Otros factores de transcripción que son regulados por SnRK1 son el Ethylene Insensitive3 (EIN3), directamente fosforilado por AKIN10 lo que provoca su represión y retrasa la senescencia en hojas (Kim *et al.*, 2017), y el factor de transcripción del dominio B3 FUSCA3(FUS3) que actúa como el interruptor metabólico entre la dormancia y la germinación (Tsai y Gazzarrini, 2012). Por otro lado, la fosforilación de las SnRK1 también regula la degradación de algunos factores de transcripción vía proteosoma, como es el caso de los factores de transcripción MYC2, que regulan la señalización por jasmonatos, y WRINKLED1 (WRI1), que regula positivamente la glicólisis y la biosíntesis de lípidos (Im *et al.*, 2014; Zhai *et al.*, 2017).

La SnRK1 modula la actividad de la ADP glucosa pirofosforilasa, a través de su activación redox en respuesta a altas concentraciones de sacarosa (Tiessen *et al.*, 2003) lo que la involucra directamente en la síntesis de almidón. En otros experimentos realizados en el musgo *Physcomitrella patens*, una doble mutante en los genes que codifican para las subunidades catalíticas presenta defectos en la acumulación de almidón y es viable únicamente en condiciones de luz continua (Thelander *et al.*, 2004). En semillas de chícharo la disminución de la expresión de SnRK1 por medio de un RNAi afectó la transcripción de 183 genes, las plantas mostraron una relación carbono/nitrógeno mayor que la de las tipo silvestre y alteraciones fenotípicas como defectos de maduración, contenido bajo de globulinas y niveles de sacarosa elevados, parecidos a los que se presentan en mutantes insensibles a ABA. Además, se ha demostrado que también regulan la expresión génica de la α -amilasa y la sacarosa sintasa (Purcell *et al.*, 1998; Laurie *et al.*, 2003), de manera que estarían directamente relacionadas con la regulación del metabolismo de carbono en plantas, lo que les confiere, además de la semejanza en conformación y secuencia, similitud funcional con sus contrapartes en levaduras y mamíferos, además de la semejanza en conformación y secuencia. En general, se acepta el papel de las SnRK1 como un regulador central de la señalización en respuesta a una disminución en el contenido energético celular sin embargo aún no está clara la conexión entre las SnRK1 y los principales compartimientos productores de energía, el cloroplasto y la mitocondria, aunque se postula que existen señales emitidas y recibidas por estos organelos que favorecen la activación o inactivación del complejo SnRK1 en respuesta a diversas condiciones de estrés (figura 6) (Baena-González y Sheen, 2008; Broeckx *et al.*, 2016, Wurzinger *et al.*, 2018).

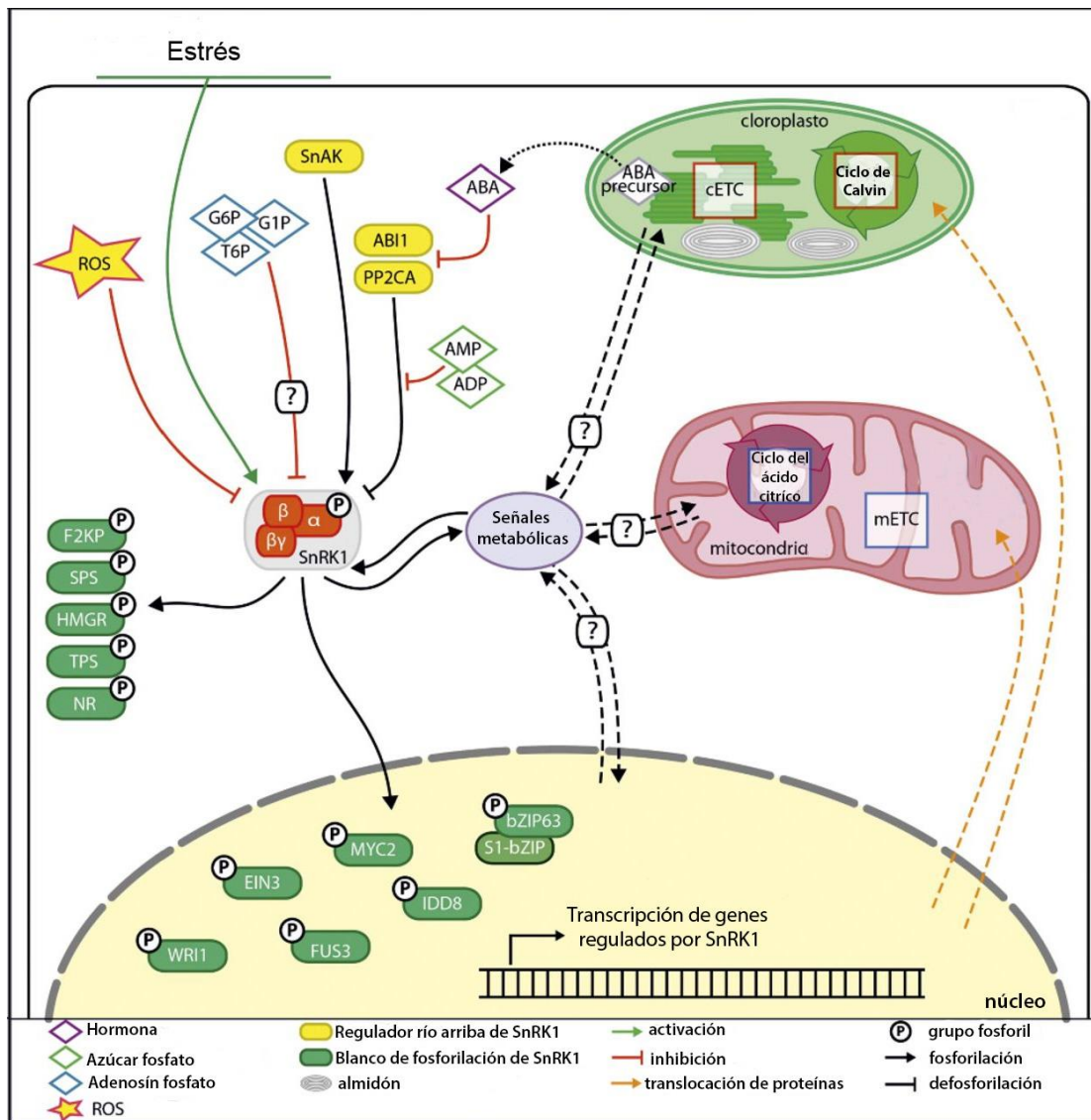


Figura 6. Regulación y moléculas blanco de SnRK1. Se muestran las diferentes formas conocidas de regulación de las SnRK1 y sus blancos directos de fosforilación; además se esquematiza el posible papel de mitocondrias y cloroplastos en la emisión y recepción de señales metabólicas que contribuirían a la activación del complejo SnRK1. Modificado de Wurzinger *et al.*, 2018.

1.3.4 SnRK1 como un intermediario en la transducción de señales por deficiencia de fosfato

De los datos expuestos sobre la SnRK1 resulta evidente que se trata de complejos proteicos capaces de regular varios procesos metabólicos que en conjunto permiten al organismo sobrevivir

condiciones de estrés y mantener la homeostasis energética. Además, durante el estrés por deficiencia de fosfato en las plantas, los niveles de ATP disminuyen, con la consecuente baja energética, y ya que las SnRK1 son sensores del contenido energético (Crozet *et al.*, 2014) podrían estar involucradas en la regulación de algunas de las respuestas que presentan las plantas durante dicho estrés, particularmente actuando en la regulación del metabolismo de carbono. Por lo anterior se propone la siguiente hipótesis:

2 Hipótesis

Las isoformas de SnRK1, AKIN10 y AKIN11, se regulan diferencialmente durante la deficiencia de fosfato y participan en el metabolismo de almidón y en la regulación de la expresión genética durante este estrés nutricional.

3 Objetivos

3.1 General

Caracterizar la actividad de las SnRK1 y determinar su función durante la deficiencia de fosfato

3.2 Particulares

- Determinar las condiciones óptimas para la evaluación de la actividad de SnRK1 en plantas de *Arabidopsis thaliana*.
- Determinar el efecto de la deficiencia de Pi sobre la actividad de SnRK1
- Determinar si la subunidad catalítica del complejo varía durante la deficiencia de fosfato,
- Evaluar el estado de activación del complejo durante la deficiencia de fosfato
- Identificar si se altera la acumulación de almidón durante la deficiencia de fosfato en mutantes y transgénicas de SnRK1
- Evaluar el efecto en la regulación transcripcional de mutantes en la subunidad AKIN10

4.1 Material biológico

En este trabajo se utilizaron plantas tipo silvestre de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0). Las mutantes *akin10* fueron obtenidas de la colección del instituto SALK de líneas de mutantes por inserciones de T-DNA (Alonso et al., 2003). Se pidió al ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center, The Ohio University) la línea SALK_127939 (T3) y se comprobó la homocigocidad de las plantas para la inserción de T-DNA a través de un PCR-dúplex realizado a partir de DNA total, extraído de las plantas mutantes utilizando el kit GenElute Plant Genomic DNA Miniprep (SIGMA). Los cebadores específicos para la amplificación de un fragmento genómico silvestre (WT) y del mutante (integración del T-DNA) fueron los siguientes: LP (5'-CAGATGGGTTCTAACAGCAG-3') y RP (5'-CAGATGGGTTCTAACAGCAG-3' en combinación con el cebador específico para T-DNA Lb1 (5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3').

4.2 Siembra y cuidado de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de plantas silvestres, mutantes y transgénicas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, se sembraron en macetas con sustrato comercial (Metro-Mix® 200) humedecido con agua desionizada. Las macetas se cubrieron con bolsas negras y se colocaron a 4°C por dos días para romper la dormancia y homologar la germinación, después se transfirieron a cámaras de cultivo bajo condiciones de día corto (8 h de luz/16 h de oscuridad) con un flujo fotónico de 120 μmol de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (lámpara fluorescente) y se regaron cada tercer día con solución Hoagland modificada que contenía:

6 mM KNO_3 , 4mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.046 mM H_3BO_3 , 0.8 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.09 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.046 mM H_3BO_3 , 0.8 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.003 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.015 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 500 μM de $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ y 0.01 g/L de Fe-EDTA (Jones, 1982).

Para el tratamiento de deficiencia nutrimental de fosfato, plantas de tres semanas de crecimiento se trasplantaron a agrolita humedecida con agua desionizada en las mismas condiciones de cultivo y se regaron con solución de Hoagland con 500 μM $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (Pi+) o con 500 μM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para la solución sin fosfato (Pi-). Las plantas se cosecharon y congelaron con nitrógeno líquido después de 5 y 10 días de tratamiento y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para la transformación, las plantas se mantuvieron en Metro-Mix[®] 200 y se regaron con solución de Hoagland completa cada tercer día, a estas plantas se les cortó la primera inflorescencia para romper la dormancia apical y generar ramificaciones que produjeron una mayor cantidad de botones florales.

4.3 Anticuerpos contra la subunidad catalítica AKIN10 y AKIN11 (anti α)

Para detectar a la proteína se mandó sintetizar a SIGMA[®] el péptido MEEK (MEEKVRREIKILRL) que forma parte del dominio catalítico tanto de AKIN 10 como de AKIN11. Para generar los anticuerpos, se conjugó el péptido a la hemocianina siguiendo el protocolo establecido en Harlow y Lane (1988). Previo a la inmunización se obtuvo el suero preinmune, posteriormente el péptido conjugado (200 μ g) se combinó con adyuvante completo de Freund se llevó a un volumen de 1 mL y se inyectó por vía subcutánea a una coneja Nueva Zelanda. Se realizaron dos inmunizaciones más con el péptido mezclado con el adyuvante incompleto de Freund a la segunda y sexta semana después de la primera inyección. El sangrado final se realizó por punción cardiaca 9 días después de la tercera inyección. La fracción de IgG's se precipitó con sulfato de amonio y se pasó por una columna de proteína A-sefarosa (Kruger y Hammond, 1988). Los anticuerpos se titularon y se utilizaron para detectar ambas subunidades α , por lo que fue necesario realizar una doble dimensión para distinguir entre ambas subunidades catalíticas.

4.4 Separación de las subunidades catalíticas por electroforesis bidimensional

Para la realización de la doble dimensión se utilizaron 20 μ g de extractos proteicos cloroplásticos de plantas silvestres y mutantes *akin10* siguiendo el protocolo de la unidad Multiphor II Electrophoresis Unit (Amersham). La primera dimensión se hizo con un isoelectroenfoco en tiras con gradiente de pH de 4 a 7. En la segunda dimensión, las proteínas se separaron en un SDS-PAGE al 12%. Después de la corrida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se inmunodetectó con el anticuerpo anti alfa.

4.5 Experimentos con RNA

4.5.1 Extracción

La extracción del RNA total de rosetas de *Arabidopsis*, ya sea mutantes o tipo silvestre crecidas en suficiencia o deficiencia de fosfato, se llevó a cabo utilizando el reactivo TRIzol® de acuerdo las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Brevemente, por cada 100 mg de tejido se adicionó 1 mL de TRIzol® y se homogenizó en un mortero estéril. El homogenado se transfirió a un microtubo y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, posteriormente, se agregaron 0.2 mL de cloroformo y se incubó durante 3 min más; las muestras se centrifugaron a 12, 000 x g a 4°C, se recuperó la fase acuosa en un microtubo nuevo y el RNA se precipitó utilizando 0.5 mL de isopropanol después de 10 min a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 12000 x g, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 75%. La pastilla se secó al aire durante 5-10 min y se resuspendió en 50 µL de agua destilada libre de RNAsas. Las muestras de RNA se cuantificaron espectrofotométricamente a una longitud de onda de 260 nm utilizando la relación: $A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 40 = \mu\text{g RNA/mL}$

4.5.2 RT-PCR

El cDNA se sintetizó utilizando ImProm-II™ Reverse Transcription System de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). Brevemente, se colocaron los microtubos en hielo y se adicionaron 1 µg de RNA total, 0.5µg/reacción de oligo dT o 10-20 pmol de cebadores específicos y agua libre de nucleasas hasta un volumen de 5 µL. Los microtubos se calentaron a 70°C por 5 min y se enfriaron hielo por al menos 5 min. Los microtubos se centrifugaron para colectar toda la mezcla y se les adicionaron 4 µL de amortiguador de reacción (5X), 1.5 mM MgCl₂, dNTP mix (0.5 mM), 20 µL inhibidor de ribonucleasa y 1 µL de transcriptasa reversa y se llevó a un volumen final de reacción de 20 µL. Los microtubos se incubaron a 25° C durante 5 min, posteriormente a 55° C durante 60 min y finalmente a 70°C durante 15 min. Los oligonucleótidos específicos (forward y reverse, tabla 3) diseñados para amplificar los genes de interés fueron los siguientes:

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados como cebadores en esta tesis para amplificar genes o fragmentos de genes de *Arabidopsis thaliana*.

Gen	Forward	Reverse
AKIN10 (At3g01090)	5'-CACCATGGATGGATCAGGCACA-3'	5'-GAGGACTCGGAGCTGAGCAAG-3'
AKIN10 300	5'-AACAGCAGCGCAGATGGTATGC-3'	5'-GAGGTATTTGAGTAGAGCACGC -3'
AKIN11 (At3g29160)	5'-CACCATGGATCATTCATCAAAT-3'	5'-GATCACACGAAGCTCTGTAAG-3'
AKIN11 300	5'-GGTTTAGCTGATGGTCAGAATACTATGGT-3'	5'-GGATAGTTACTATTACAGTAGAGTTAAC-3
GFPprev	-----	5'-GTAAGGACAGGGCCATCGCC-3'
SPS4 (At4g10120)	5'-GCTAGCCTCAGGTTCAAGCT-3'	5'-TGTGGAGGCCACCCAGTAAG-3'
SPS2 (At5g11110)	5'-TTCGCTGGGGTGGAGAGAG-3'	5'-AGAGCGACCTTAATGGCGTC-3'
HEX1 (At2g19860)	5'-TGCGATATCGTCCACCTA-3'	5'-TGAGAGTGAGAAGCAGCAAG-3'
GAL1 (At3g06580)	5'-CCATACACGGCTGAGGAGAT-3'	5'-AGAGCGACCTTAATGGCGTC-3'
THF1 (At2g20890)	5'-CAAGCGACCCATCCCGAGTA-3'	5'-TGCTTCTTCTTCTCCCTCTC-3'
TMT2 (At4g35300)	5'-TTGAGCAGGCGGGTGTGCGG-3'	5'-GCAGCACGGGGAGACTGTAA-3'
FBP (At5g10770)	5'-CAGGGATCTTCGACGGCTCT-3'	5'-CGTCCACACAAATTCAGGCG-3'
RAB (At3g09900)	5'-ATATGGGACACTGCTGGAC- 3'	5'-TGATCCCTTGGGGCTCGGCT-3'
SKP (At3g54480)	5'-TTGCCTGGTCGGTGGAGGCG-3'	5'-CGAACACGCTGCAGAACCAA-3'
CP (At3g19400)	5'-AACGCTGGATGTGATGGAGG-3'	5'-GGGTAAGAAGGCATCATTGC-3'
NPH (At1g03010)	5'-AGCTTGTAGCCACGCAGCTC-3'	5'-GCCTTGCCACTCAAGGAAGG-3'
ACTINA	5'-TGGGGCAGAAGGATGCGTATG-3'	5'-CAATACCAGTTGTACGGCCAC-3'
At4	5'CCCCTAAAGAACTGAAGCTCAAGAA-3'	5'GGAACATAAACATATAAGAGCTAT-3'

El cDNA se amplificó por PCR utilizando la enzima Taq polimerasa recombinante (Invitrogen) y los oligonucleótidos diseñados específicamente para cada gen. El programa que se utilizó en todos los casos fue de 30 ciclos: 94°C 30 segundos- 55-60°C 1 min y 72°C 100 s en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Perkin Elmer). La mezcla para las reacciones fue la siguiente 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl₂, 500 ng DNA molde, 0.5 μM oligonucleótidos y 1.5 U *taq* polimerasa (Invitrogen). Los productos de PCR se corrieron en una electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE (Tris-acetato, EDTA) con bromuro de etidio para la visualización de los productos con luz ultravioleta.

4.5.3 Microarreglos

Para el análisis por microarreglos se solicitaron dos chips del laboratorio del Dr. David Galbraith (Arizona University, USA. <http://www.ag.arizona.edu/microarray/>), con números de referencia ATv342_156 y ATv342_157, los cuáles se enviaron para su procesamiento a la unidad de microarreglos del Instituto de Fisiología Celular, junto con 50 μg de RNA de las plantas tipo silvestre y 50 μg de RNA de la mutante *akin10*, ambos extraídos de plantas crecidas con deficiencia de fosfato.

Los resultados de la cuantificación de las imágenes se analizaron como SWAP y se obtuvieron las listas de genes regulados positiva y negativamente en la mutante con respecto al control.

4.6 Plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan las subunidades catalíticas fusionadas a GFP

4.6.1 Construcción del gen recombinante entre las subunidades catalíticas y GFP

Se solicitaron al *Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)* clonas en *Escherichia coli*, de las regiones ORF tanto de *AKIN10* como de *AKIN11*. Dichas regiones se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos para amplificar *AKIN10* y *AKIN11* mencionados en la tabla 3 y se introdujeron en el vector de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen) (figura 7) para ser recombinadas mediante la tecnología Gateway® en el vector binario pEarlyGate 103. Este vector permitió fusionar en la región del 3' de las subunidades catalíticas a la secuencia codificante para la Proteína Verde Fluorescente

(GFP, por sus siglas en inglés). La secuencia química quedó bajo la regulación del promotor constitutivo 35S del virus de mosaico de la coliflor (figura 1, Earley *et al.*, 2006.)

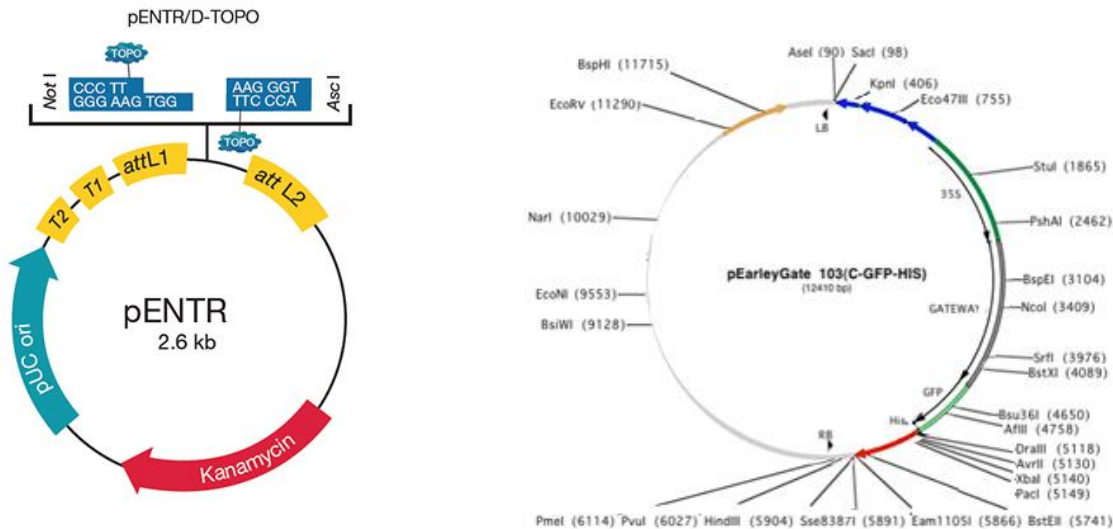


Figura 7. Plásmidos utilizados para obtener la construcción recombinante entre los genes que codifican para la subunidad catalítica del complejo SnRK1 y la proteína verde fluorescente (Earley *et al.*, 2006)

4.6.2 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación de *A. tumefaciens* se realizó por el método de congelado-descongelado descrito por Höfgen y Willmitzer en 1988. Un cultivo de *A. tumefaciens* crecido durante toda la noche se llevó a un volumen de 200 mL utilizando medio LB. Después de 3-4 h de incubación, las células en crecimiento se centrifugaron a 3000 x g por 30 min a 4°C, la pastilla se lavó una vez con amortiguador TE (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA) preenfriado y se resuspendieron las células en 20 mL de medio LB fresco. Se tomaron alícuotas de 500 µL que se usaron directamente para la transformación; o bien, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C por máximo 3 meses.

Para la transformación, se descongelaron las células previamente preparadas y se mezclaron con 5 µg del vector binario del sistema Gateway (pEarlyGate103) solo o conteniendo el cDNA de la subunidad catalítica de *AKIN10* o el de *AKIN11*. Las células se incubaron sucesivamente 5 min en hielo, 5 min en nitrógeno líquido y 5 min a 37°C, posteriormente, se agregaron 50 µl más de medio LB. Las células se agitaron de 2 a 4 h a 28°C. Pasado este tiempo se tomaron alícuotas de 200 µL y

se plaquearon en cajas de Petri preparadas con medio LB conteniendo kanamicina (50 µg/mL) como medio de selección. Las cajas de Petri se incubaron a 28° C durante dos o tres días. De las colonias obtenidas se obtuvieron plásmidos que se utilizaron como molde para llevar a cabo un PCR y comprobar que el plásmido se hubiera transferido.

Para obtener el cultivo que se utilizaría en la transformación de *Arabidopsis*, se cultivaron las bacterias de *A. tumefaciens* en medio LB con los marcadores de selección a 28°C en agitación constante hasta alcanzar una D.O₆₀₀ de 0.8. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min, se decantó y la pastilla se resuspendió gentilmente en 50 mL de una solución 5% (V/V) de sacarosa y 0.01% Silwet L-77.

4.6.3 Transformación de las plantas de *Arabidopsis*

Las plantas que serían transformadas por el método de inmersión floral (Clough y Bent, 1998) se cultivaron como se describe en el subcapítulo Siembra y cuidado de *Arabidopsis thaliana* (pág.29) con una variación, que consistió en que cuándo estas plantas iniciaron la floración, se cortó la inflorescencia para favorecer la ramificación y formar más botones florales. Una vez conseguido lo anterior, la parte aérea de estas plantas se sumergió en la suspensión bacteriana previamente preparada, durante 1 min.

Las plantas se mantuvieron en oscuridad a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente, se trasladaron al invernadero manteniendo un fotoperiodo largo (16h de luz x 8 de oscuridad). Las plantas se cuidaron de la manera habitual hasta la formación de semillas, en ese momento se suspendió el riego y se esperó a que se secaran completamente las silicuas. Las semillas de cada planta se cosecharon independientemente y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Para la selección de las transgénicas, las semillas se desinfectaron utilizando una solución de hipoclorito de sodio (50% NaOCl, 0.006% Tween 20) durante 1 min, agitando vigorosamente para dispersar las semillas. Las semillas se lavaron con abundante agua estéril y se sembraron en cajas de Petri con medio Gamborg B5-agar, utilizando 300 µM de glufosinato de amonio (BASTA®) como medio de selección. Las semillas se colocaron en oscuridad por 48 h a 4°C y se trasladaron a cámaras de crecimiento con fotoperiodo corto a una temperatura entre 21-23°C. Después de que las semillas germinaron, las plántulas supervivientes se trasplantaron a tierra (Metro Mix®200). Las plantas

crecieron bajo fotoperiodo largo y las semillas de las plantas seleccionadas se cosecharon nuevamente, este procedimiento se realizó hasta obtener la generación T2.

Para corroborar que las plantas resistentes al BASTA® fueran transgénicas, se aisló DNA genómico y se realizó una reacción de PCR por cada planta, utilizando las parejas de oligonucleótidos que amplifican la proteína de fusión con la GFP.

El producto de las PCR fue purificado y se mandó secuenciar a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (UNAM), para corroborar la identidad del inserto.

Con esta metodología se obtuvieron:

- Plantas transgénicas que sobreexpresaban la proteína AKIN10 fusionada con la GFP (AKIN10-GFP),
- Plantas transgénicas que sobreexpresaban la proteína AKIN11 fusionada con la GFP (AKIN11-GFP) y
- Plantas transgénicas que sobreexpresaban la proteína verde fluorescente (GFP-control)

4.7 Localización subcelular de las subunidades catalíticas de SnRK1

4.7.1 Fluorescencia

Mediante microscopía confocal se observaron cortes finos de hoja de plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresaban tanto AKIN10 como AKIN11 en fusión con la proteína verde fluorescente, con el objeto de determinar la localización de la proteína de fusión en condiciones de suficiencia y deficiencia de fosfato. Como control se utilizaron plantas que solo se habían transformado con GFP. Para observar las proteínas de fusión con GFP, se montaron secciones de 6-7 μm de hojas y se observaron utilizando el microscopio confocal Olympus FV 1000 (FlouView® 1000) en la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital.

4.7.2 Inmunolocalización

La preparación de las muestras consistió obtener hojas y raíces de planta sometidas a suficiencia y deficiencia de fosfato, fijarlas en formaldehído al 4% (V/V) en solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) durante 12 h, deshidratarlas en series crecientes de etanol (70%, 90%, 96% y 100%) de

30 min cada uno y embeberlas en parafina Paraplast Plus® (Polysciences). Una vez obtenidos los cubos conteniendo las muestras se cortaron con un micrótopo en el Instituto de Biología, para obtener secciones de 6 a 7 μm que se montaron en portaobjetos de vidrio.

Una vez fijadas estas secciones en los portaobjetos, se desparafinaron en frascos de tinción de Coplin con tres lavados de 10 min con etanol al 95%. Para rehidratar los cortes se incubaron en etanol al 90% durante 5 min, en etanol al 50% 5 min, Etanol 50% v/v con PBS 5 min y finalmente 5 min en PBS.

Las secciones se bloquearon con PBS conteniendo 3% de BSA, 0.01% azida de sodio, y 0.1% Triton X-100 por 4 h a 4°C. Estas secciones se incubaron con el anticuerpo primario de conejo anti α , obtenido según se indicó en la sección 4.3 en una dilución 1:250 a 4°C toda la noche. Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con el segundo anticuerpo cabra anti-conejo conjugado con el fluorocromo Alexa 568 (ThermoFisher Scientific) por 4 h a 4°C.

4.7.3 Experimentos tipo Western (Inmunoblot)

4.7.3.1 Obtención de extracto de proteína total

Para la extracción de proteína total soluble se molió en un mortero frío y con nitrógeno líquido 0.1 g de roseta en solución amortiguadora de extracción (50 mM HEPES pH 8.2, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na_3VO_4 , 50 mM NaCl, 10 mM, β -glicerol fosfato, 8% (v/v) glicerol, 1 mM ditiotreitól, 1 mM fluoruro de fenil metil sulfonil, 1 mM benzamidina, y 50 mM leupeptina. La proteína se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

4.7.3.2 Obtención de cloroplastos

Los cloroplastos se obtuvieron de acuerdo con el procedimiento modificado de Weigel y Grazebrook, 2002. Las plantas se mantuvieron en oscuridad durante las 5 horas anteriores a la cosecha, se colectaron las rosetas y se les agregaron 5 volúmenes de una solución amortiguadora de homogeneización que contenía Hepes 50 mM (pH 7.5), EDTA 2 mM, MgCl_2 1 mM, sorbitol 6 % (p/v) y albúmina bovina 0.25% p/v. El tejido se homogeneizó en una licuadora dando 5 pulsos cortos de aproximadamente 5 s cada uno. El material molido se filtró a través de una malla de nylon y el filtrado se centrifugó a 2000 x g por 8 min. El sobrenadante se decantó y el sedimento con los cloroplastos se resuspendió cuidadosamente con un pincel en el amortiguador de homogeneización remanente. Este material se cargó con pipeta de un mililitro con la punta recortada sobre un

gradiente de Percoll preparado como se muestra en la Tabla 4. Se centrifugó a 6000 x g por 10 min, sin freno, en un rotor Sorvall HB4; luego, se recuperó la banda de la interfase 40/80 y se centrifugó a 2000 x g por 8 min. La pastilla se lavó con amortiguador de homogeneización sin BSA y se centrifugó a 2000 x g por 8 min. Los cloroplastos se resuspendieron en el amortiguador de extracción de proteína total mencionado anteriormente.

Tabla 4. Ingredientes para hacer Percoll 80% y 40%. Las cantidades indicadas son las necesarias para hacer dos gradientes. PBF Percoll: 450 mg PEG 4000, 150 mg BSA, 150 mg Ficoll y 15 mL Percoll (Bernal, 2009).

	Percoll 80%	Percoll 40%
PBF Percoll	5 mL	8mL
Agua destilada	-	7.6 mL
EDTA 0.5 M (pH8)	25 μ L	80 μ L
MgCl₂ 1 M	8.2 μ L	20 μ L
MnCl₂ 1 M	8.2 μ L	20 μ L
Amortiguador HEPES 1 M (pH 7.5)	312 μ L	1 mL
Sorbitol 2 M	1 mL	3.3 mL

4.7.3.3 Gel de Acrilamida Desnaturalizante (SDS-PAGE)

Se utilizaron 20 μ g de proteína total y 10 μ g de proteína de extracto cloroplástico, a cada muestra se agregaron 20 μ L de buffer de carga (60 mM Tris, pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.001 azul de bromofenol, 10% glicerol), y se colocaron en un baño a ebullición durante 5 min. Las muestras se corrieron en un SDS-PAGE al 12% (Laemmli,1970) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema húmedo de BIORAD. La transferencia de las proteínas se verificó utilizando una solución de rojo de Ponceau (1% rojo de Ponceau en 0.1% ácido acético) por 3 min y se lavó con agua destilada. La membrana se bloqueó en un amortiguador que contenía 1X PBST (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 0.1% Tween-20) y 5% de leche descremada durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo contra GFP (Sigma) se utilizó a una dilución de

1:2 000 y se incubó a 4°C toda la noche. La membrana se lavó 3 veces con solución de PBST por 15 min. La incubación de la membrana con el segundo anticuerpo se realizó durante una hora a temperatura ambiente. La dilución utilizada para el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa fue de 1:40 000. El segundo anticuerpo se reveló utilizando el ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham).

4.8 Ensayo de Actividad de cinasa SnRK1

4.8.1 Extracción de la cinasa:

Las hojas congeladas de *Arabidopsis* se homogeneizaron en un mortero frío con amortiguador de extracción (50 mM HEPES pH 8.2, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 50 mM NaCl, 10 mM, β-glicerol fosfato, 8% (v/v) glicerol, 1 mM ditioneitol, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoride, 1 mM benzamidina, 50 mM leupeptina). El extracto se centrifugó a 20 000 x g por 10 min a 4°C. El extracto proteico obtenido se precipitó añadiendo polietilen-glicol hasta una concentración de 11% (p/v). La solución se agitó suavemente durante 20 min y se centrifugó a 20000 x g por 30 min. La pastilla resultante se disolvió en 30 μl de amortiguador extracción y la cantidad de proteína se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976).

4.8.2 Actividad SNRK1

La actividad de cinasa sobre el péptido SAMS se determinó como lo describieron Davies *et al.* (1989), con algunas modificaciones: 2 μg de proteína se incubaron durante 10 min en un volumen final de 25 μL conteniendo amortiguador de cinasa (40 mM HEPES pH7.0, 50 mM fluoruro de sodio, 25 mM β-glicerofosfato, 50 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, y 1mM Na₃VO₄), 200 μM de péptido SAMS (HMRSAMSGHLVKRR), 200 μM ATP, y [γ-³²P]ATP (200 μM, 5 μCi /μL, 3000 Ci/mmol). Después de incubar por 10 min a 30°C, alícuotas de 15 μL se colocaron en 1 cm² de papel de fosfocelulosa (P81, Whatman), el cual se lavó inmediatamente en un recipiente que contenía 500 mL de una solución de ácido fosfórico al 1% (V/V). Los filtros se lavaron durante 20 min con tres cambios de la misma solución. Al final se lavaron con acetona, se dejaron secar al aire y se cuantificaron por inmersión en 5 mL de líquido de centelleo (5 g/L 2,5 difeniloxazol (PPO), 0.1 g/l 1,4-di[2-(4-metil-5-feniloxazolil)]-benceno (POPOP), utilizando como disolvente tolueno) en un contador de centelleo (LS6000/BECKMAN).

4.9 Marcaje con $^{14}\text{CO}_2$ y cuantificación de almidón

Las rosetas fueron marcadas con $^{14}\text{CO}_2$ como lo describen Viola *et al.*, (2001). Cinco horas después de haber comenzado el periodo de luz, las plantas se incubaron con el $^{14}\text{CO}_2$ liberado de 50 μCi de bicarbonato de sodio [^{14}C] después de la adición de 200 μL de ácido láctico 3 M. Las plantas se expusieron al $^{14}\text{CO}_2$ liberado durante 1 h, antes de inyectarse un exceso de 3 M de KOH para neutralizar el ácido. Un grupo de plantas se analizó después de cuatro horas, para permitir la llegada del CO_2 a los tejidos demanda, y otro se analizó hasta después de 18 h en oscuridad.

Para el aislamiento y cuantificación de almidón, las muestras (150-300 mg de hoja) se homogeneizaron en etanol al 80% (2 mL) y se calentaron por 30 min a 80°C . El extracto se centrifugó a 5000 x g durante 10 min. Para la determinación de cantidad de marca el precipitado se cuantificó en un contador de centelleo, para continuar con la extracción de etanol, el precipitado se extrajo con etanol una vez más. Los sobrenadantes se combinaron y esta fracción se usó para la medición de glucosa. La fracción sedimentada se resuspendió en 1.5 mL de agua y se gelatinizó a 90°C durante 4 h. Después se hidrolizó con 220 U de amiloglucosidasa (EC 3.2.1.3) resuspendida en 15 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio 200 mM (pH 4.5) y se incubó a 37°C toda la noche. Al día siguiente, el material se centrifugó a 5000 x g por 5 min y se cuantificó la glucosa en el sobrenadante (Bernal *et al.*, 2005). La glucosa marcada con CO_2 incorporada al almidón se cuantificó en un contador de centelleo y se reportó como la diferencia entre la asociada al almidón al final del día respecto de la que se encontraba al final de la noche.

5 Resultados

5.1 Actividad de SnRK1 y deficiencia de Fosfato

Se evaluó la actividad de SnRK1 mediante la fosforilación del péptido SAMS en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*, var Columbia, sometidas a deficiencia de fosfato durante 10 días, las diferencias en las plantas pueden ser observadas en la figura 8A. Las plantas sometidas a la deficiencia de fosfato son más pequeñas y presentaron pigmentación morada respecto a las plantas crecidas en suficiencia nutricional. Por otro lado, en la figura 8B se observa que la actividad de SnRK1 resultó ser menor en las plantas crecidas en deficiencia de fosfato.

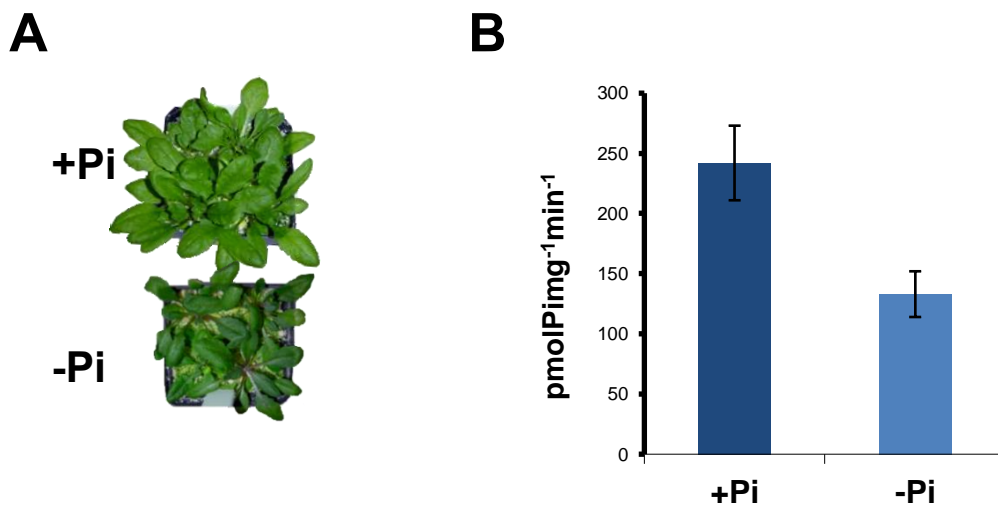


Figura 8. Actividad de SnRK1 en deficiencia de fosfato en plantas silvestres. (A) Rosetas de plantas crecidas en suficiencia y deficiencia de fosfato. Las plantas se crecieron primero durante 3 semanas en condiciones de suficiencia nutricional y posteriormente se trasladaron a agrolita y se regaron durante 10 días con soluciones conteniendo o no fosfato. (B) Actividad de SnRK1 durante la deficiencia de fosfato en *Arabidopsis thaliana* la actividad SnRK1 se evaluó como fosforilación del péptido SAMS en rosetas de *Arabidopsis* a los 10 días de crecer bajo deficiencia de fosfato. Las barras representan las medias \pm la desviación estándar ($n=3$).

Debido a que la actividad de SnRK1 disminuía durante la deficiencia de fosfato, se analizó la expresión de las diferentes subunidades catalíticas. Se determinó el nivel de expresión a nivel de transcritos de AKIN10 y AKIN11 (figura 9 A), puesto que acorde a datos de GENEVESTIGATOR son las únicas subunidades que se expresan en las rosetas, en condiciones de suficiencia nutricional y deficiencia de fosfato durante 5 y 10 días. Los resultados indican que la acumulación de los transcritos de las subunidades catalíticas no se ve afectada por la deficiencia de fosfato (figura 9 B).

Para este experimento se utilizó como control de carga a la actina, y como control de la deficiencia de fosfato al transcrito de *At4*, el cual se ha demostrado que se incrementa en estas condiciones nutrimentales (Burleigh y Harrison, 1998).

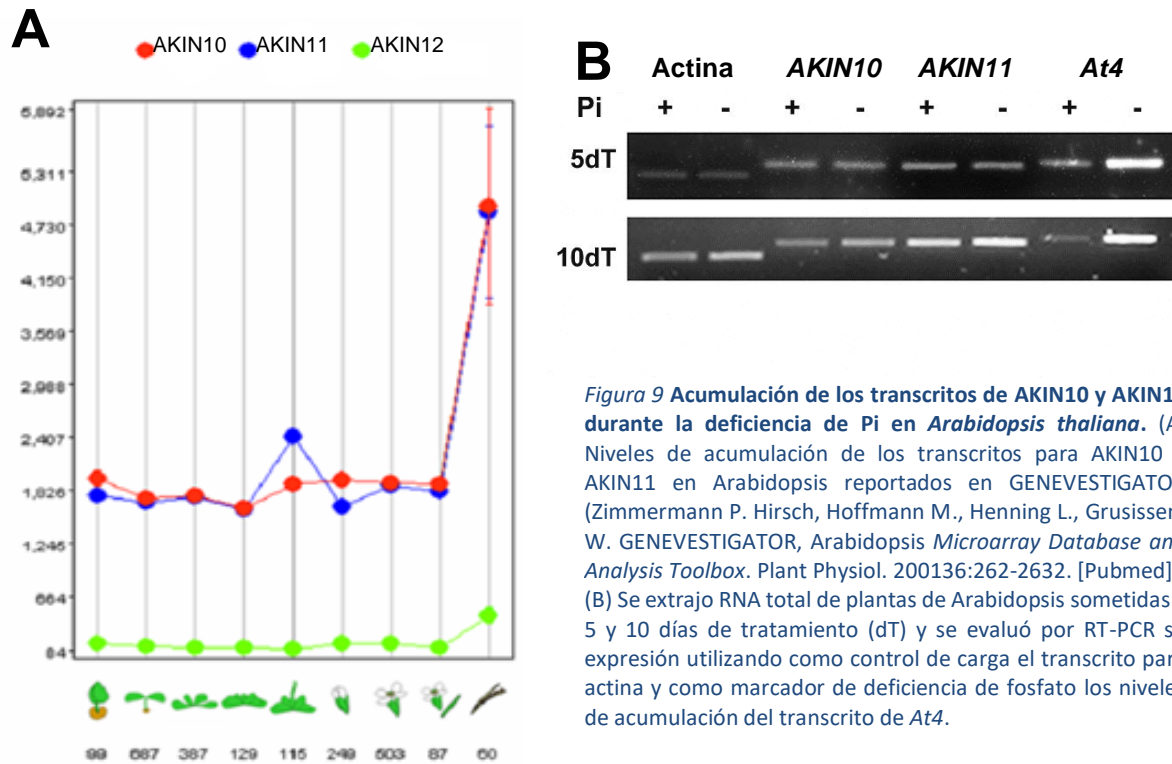


Figura 9 Acumulación de los transcritos de *AKIN10* y *AKIN11* durante la deficiencia de Pi en *Arabidopsis thaliana*. (A) Niveles de acumulación de los transcritos para *AKIN10* y *AKIN11* en *Arabidopsis* reportados en GENEVESTIGATOR (Zimmermann P. Hirsch, Hoffmann M., Henning L., Grusissem W. GENEVESTIGATOR, *Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox*. *Plant Physiol.* 200136:262-2632. [PubMed]). (B) Se extrajo RNA total de plantas de *Arabidopsis* sometidas a 5 y 10 días de tratamiento (dT) y se evaluó por RT-PCR su expresión utilizando como control de carga el transcrito para actina y como marcador de deficiencia de fosfato los niveles de acumulación del transcrito de *At4*.

5.2 Caracterización de las mutantes *akin10*

5.2.1 Obtención de mutantes *akin10* homocigotas

Las mutantes de *akin10* se obtuvieron de la colección SIGnAL T-DNA (línea SALK_127939), en la figura 10 se puede observar que el lugar de la inserción del T-DNA es en el último exón del gen que codifica para *AKIN10*.

Las semillas de las líneas mutantes se sembraron y cultivaron en las condiciones descritas en los Materiales y Métodos, y la inserción se comprobó por medio de PCR (figura 10).

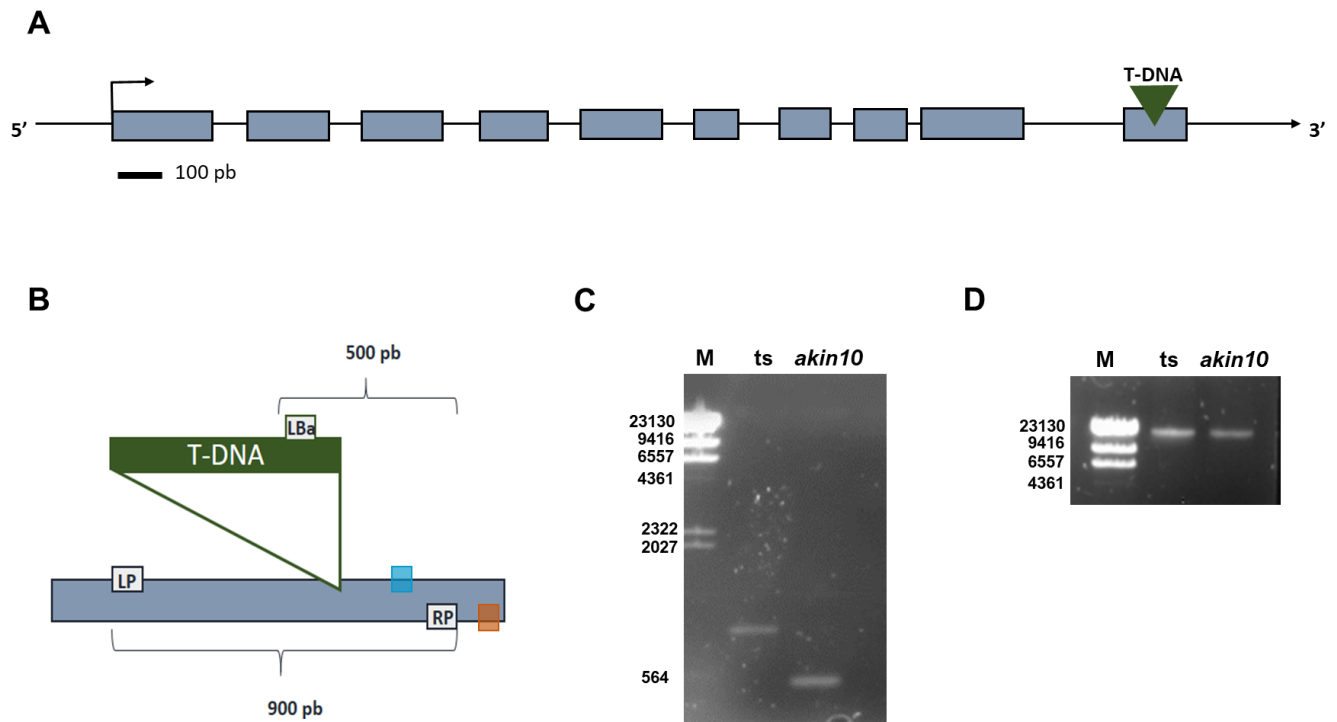


Figura 10. Homocigidad de la mutante de *akn10*. (A) Representación esquemática del gen *AKIN10* (AT3G01090) mostrando el lugar de inserción del transposón en el último exón del gen. (B) Representación esquemática de la localización de los oligonucleótidos utilizados en la determinación de homocigidad por medio de PCR dúplex, para ello se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran un fragmento de 900 pb del gen *AKIN10* (LP-RP) y se utilizó también el oligonucleótido de frente específico LBA que amplifica un extremo del T-DNA con el mismo oligonucleótido de reversa RP diseñado para amplificar *AKIN10*, los oligonucleótidos diseñados para amplificar el fragmento de *AKIN10* de aproximadamente 300 pb se ilustran con cuadros azul (adelante) y naranja (reversa). (C) Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR dúplex (utilizando los 3 oligonucleótidos LP, LBA y RP), se muestra el carril marcado con M correspondiente a los marcadores (λ HIII), el carril marcado con ts corresponde al producto de PCR con DNA proveniente de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre, se esperaba una banda de aproximadamente 900 pb (al amplificar el gen silvestre con LP y RP) y el carril marcado con *akn10* muestra el producto de PCR obtenido a partir de DNA de la mutante de *akn10* (se esperaba una banda de aproximadamente 500 pb producto de amplificar el extremo 3' del TDNA y el fragmento final de *AKIN10* con los cebadores LBA y RP). (D) Electroforesis en gel de agarosa mostrando en el carril marcado con una M los marcadores de peso molecular (únicamente los 4 primeros de L HIII) el carril marcado con ts se cargó DNA obtenido del tipo silvestre y en *akn10* DNA proveniente de la mutante.

En las mutantes *akin10*, se analizó por RT-PCR la acumulación de los transcritos de *AKIN10* y *AKIN11*, para ello se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran el mensajero de *AKIN10* completo (1500 pb) o un fragmento específico del extremo 3' (aproximadamente de 300 pb), ya sea de *AKIN10* o *AKIN11*. Como puede observarse en la figura 11, la mutante *akin10* no expresa el mensajero de *AKIN10*, mientras que el mensajero de *AKIN11* sí se expresa, los fragmentos de *AKIN10* y *AKIN11* se mandaron secuenciar (figura 12) para comprobar que correspondieran específicamente a *AKIN10* y *AKIN11*, al comparar las secuencias entre ellas se encontró que eran sustancialmente diferentes, aunque mantenían el 70% de identidad.

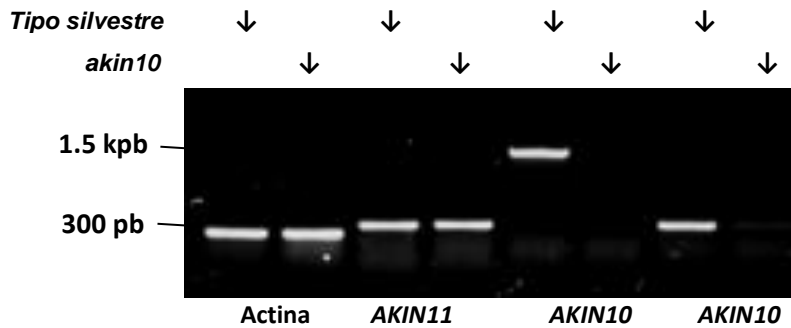
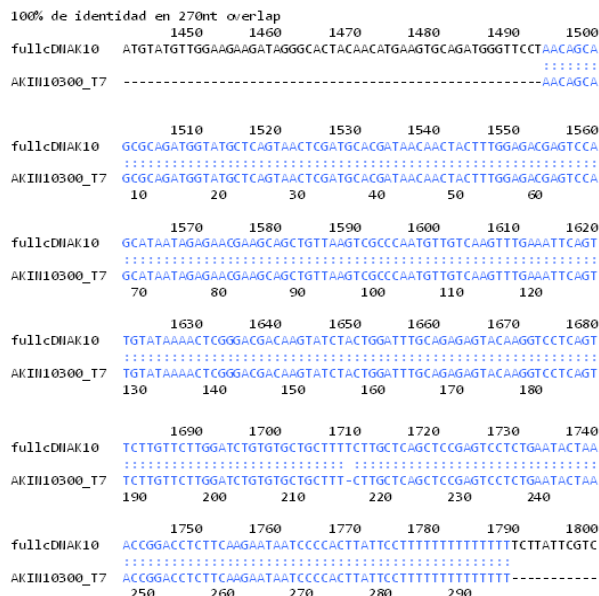


Figura 11. La mutante *akin10* no expresa el mensaje para *AKIN10*. Se obtuvo RNA de plantas *akin10* y tipo silvestres y se analizó la acumulación de los transcritos de *AKIN10* y *AKIN11* por RT-PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de aprox. 300 pb de cada uno y el ADN codificante (~1500 pb) para *AKIN10*.

A



B

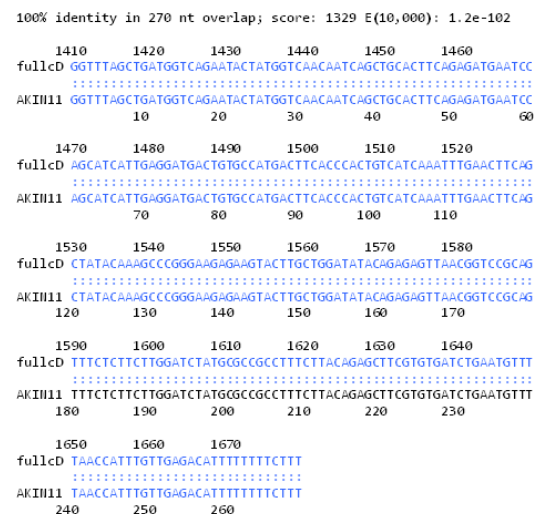


Figura 12. Alineamientos de los productos de PCR de *AKIN10* (A) y *AKIN11* (B) secuenciados, con las regiones codificantes de sus respectivos genes. 47

5.2.3 Efecto de la deficiencia de fosfato sobre las mutantes *akin10*

Para caracterizar el efecto que tiene la deficiencia de fosfato sobre las mutantes carentes de AKIN10, se trasplantaron las plantas homocigotas mutantes, crecidas en suficiencia nutrimental durante 3 semanas, a condiciones de deficiencia de fosfato durante 10 días, y se evaluó la actividad de SnRK1 a los 5 y 10 días del tratamiento. Los resultados observados en la figura 15 indican que las plantas mutantes son ligeramente más pequeñas que las plantas silvestres (figura 15 A), resultó notorio que la disminución en la actividad de SnRK1 que se presenta durante la deficiencia de fosfato en el tipo silvestre se acentúa a los 10 días de deficiencia de fosfato (figura 15 B).

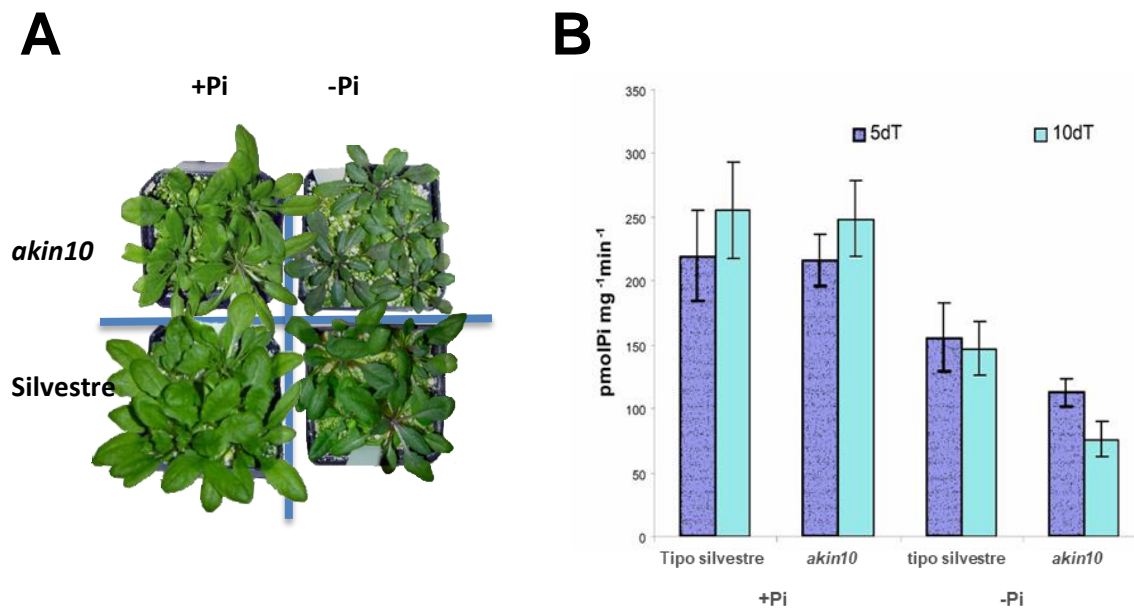


Figura 15. Efecto de la deficiencia de fosfato sobre la mutante *akin10*. (A) Diferencias en tamaño entre plantas mutantes y silvestres crecidas en suficiencia nutrimental (+Pi) o deficiencia de Pi (-Pi). (B) Actividad de SnRK1 en mutantes *akin10* y en silvestres durante suficiencia (+Pi) o deficiencia de Pi (-Pi) a los 5 (morado) o 10 (turquesa) días de tratamiento (dT). Las barras representan las medias \pm la desviación estándar (n=3). Se hizo un ANOVA con un α de 0.05 entre el tipo silvestre y el mutante a los 5 ($p=0.38$) y 10 días ($p=0.01$).

5.3 Localización subcelular de las subunidades catalíticas de las SnRK1

5.3.1 Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan las subunidades catalíticas fusionadas con la proteína verde fluorescente

Para conocer la localización subcelular de las subunidades catalíticas, las regiones codificantes de AKIN10 y AKIN11 se amplificaron por PCR y se introdujeron en un vector de entrada (pENTR/D-TOPO) que permitió recombinar ambos fragmentos, por separado, con un vector binario (pEarleyGate 103) que contenía la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (GFP) y quedar bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Con esta construcción se transformaron células de *Agrobacterium tumefaciens* y finalmente plantas de *Arabidopsis thaliana*. Las semillas de *A. thaliana* que se obtuvieron después de la transformación se sembraron en cajas de Petri con medio Gamborg B5-agar, utilizando 300 μ M de glufosinato de amonio [(BASTA[®]) como agente de selección, las plantas resistentes al herbicida se traspasaron a sustrato Metro-Mix[®] 200, se comprobó mediante PCR que tuvieran el transgén AKIN10-GFP o AKIN11-GFP (figura 16) y se siguió la descendencia hasta la T2 para continuar con los experimentos.

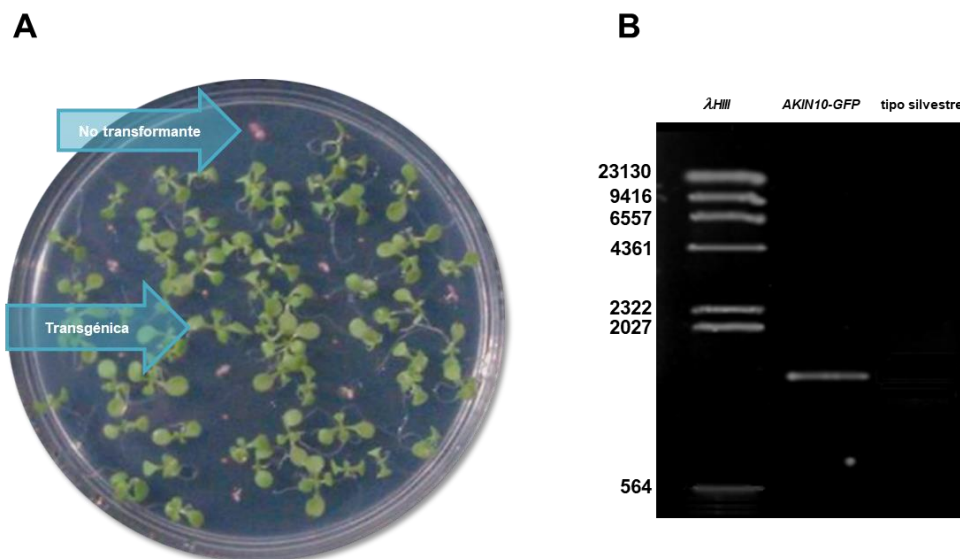


Figura 16. Selección de plantas de *Arabidopsis* transformadas con la construcción GFP-AKIN10/AKIN11 o GFP. (A) Las semillas se sembraron en cajas de Petri con medio Gamborg B5-agar y 300 mg de glufosinato de amonio (BASTA[®]) como medio de selección, las flechas señalan ejemplos de las plantas no transformantes y transgénicas (B) Electroforesis en Agarosa que muestra los productos de PCR obtenidos al utilizar el oligonucleótido forward para amplificar el cDNA completo *AKIN10* y un oligonucleótido de reversa que amplifica GFP, se amplificó cDNA del tipo silvestre como control negativo con el mismo juego de oligonucleótidos, el primer carril es la digestión del fago λ con Hind III utilizado como marcador de peso molecular. Sólo se muestra el gel de plantas AKIN10-GFP.

5.3.2 Localización subcelular de las proteínas de fusión obtenidas

Para observar la localización subcelular de las proteínas de fusión se observaron al microscopio confocal cortes de hojas de las plantas transformantes de la generación T2, los resultados indican que ambas subunidades tienen localización cloroplástica y en menor grado citoplásmica (figura 17).

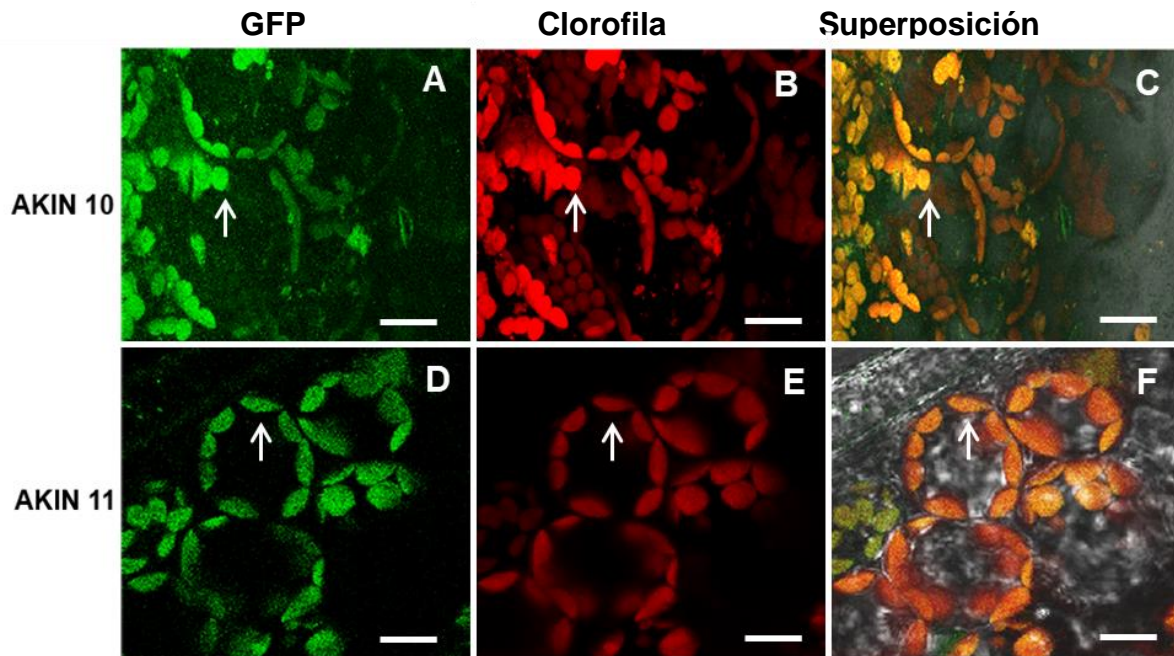


Figura 17. **Localización subcelular de las proteínas AKIN10-GFP y AKIN11-GFP.** Cortes de hojas de las plantas transgénicas que sobreexpresaban AKIN10 o AKIN11 en fusión con la GFP se observaron en el microscopio confocal. A y D muestran la fluorescencia de GFP en verde, B y E la auto fluorescencia de la clorofila en rojo y C y F la superposición de ambas en fluorescencias en amarillo. La barra blanca representa 10 μm y las flechas señalan el mismo cloroplasto en la serie de fotografías correspondientes a AKIN10 (A, B y C) y uno en la serie de AKIN11 (D, E, F).

5.3.3 Comprobación de la presencia de las subunidades catalíticas en extractos proteicos de cloroplasto

Con la finalidad de comprobar el hallazgo anterior, se hicieron extractos proteicos totales y de cloroplasto para inmunodetectar las proteínas por medio de experimentos tipo western, utilizando los anticuerpos anti- α que son capaces de reconocer a ambas subunidades catalíticas (figura 18). Los resultados muestran un enriquecimiento de la banda correspondiente a las subunidades catalíticas AKIN10 y AKIN 11, que tienen prácticamente el mismo peso molecular (60 kDa) mientras que en el extracto total no se reconoce ninguna banda. El western muestra poca cantidad de rubisco en el extracto de cloroplasto en comparación con la subunidad α de las SnRK1, esto se debe a que la membrana se sobreexpuso para apreciar las catalíticas mientras que al utilizar el anti-rubisco se expuso sólo lo suficiente para ver la banda en ambos carriles.

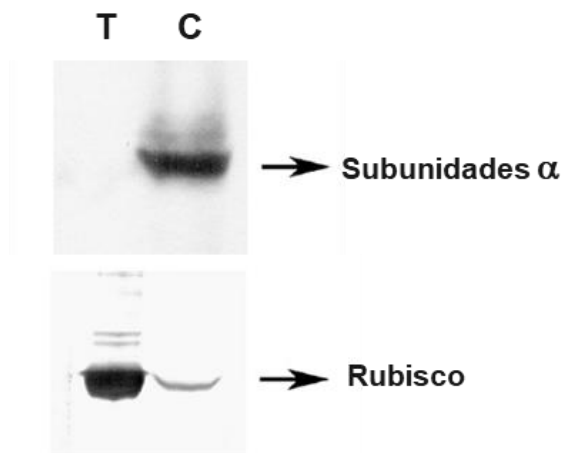


Figura 18. Localización cloroplástica de las subunidades α . Extractos proteicos totales (T) y de cloroplastos fueron separados en una SDS-PAGE, transferidos a una membrana de nitrocelulosa e incubados con el anticuerpo anti- α . La misma membrana fue incubada posteriormente con anticuerpos anti-rubisco.

5.3.4 Inmunolocalización por microscopía confocal de las subunidades catalíticas

Adicionalmente, se decidió observar la localización celular de las subunidades catalíticas mediante inmunolocalización con el anticuerpo anti- α tanto en raíz como en roseta de plantas silvestres, los resultados (figura 19) muestran que las subunidades catalíticas están en cloroplastos, aunque también se puede detectar señal en el citoplasma (Fig. 19 A-C), En las raíces, la señal se puede apreciar en todas las células desde la epidermis al tejido vascular (Fig. 19 G- I). También se observó la inmunolocalización durante la deficiencia de Pi constatando la localización cloroplástica. La señal de plantas que provienen de $-Pi$ está disminuida en comparación con plantas $+Pi$ lo que sugiere una

disminución en la cantidad de proteína de las subunidades α durante este estrés (Fig. 19 D-F); respecto a lo que sucede con las subunidades catalíticas durante la deficiencia de fosfato la señal se restringe solo al periciclo y al haz vascular mientras que la señal del córtex y de la epidermis desapareció casi por completo (Fig. 19 J-L), estos resultados indican que la regulación de las subunidades catalíticas está influenciada por la deficiencia de Pi, tanto en hoja como en raíz.

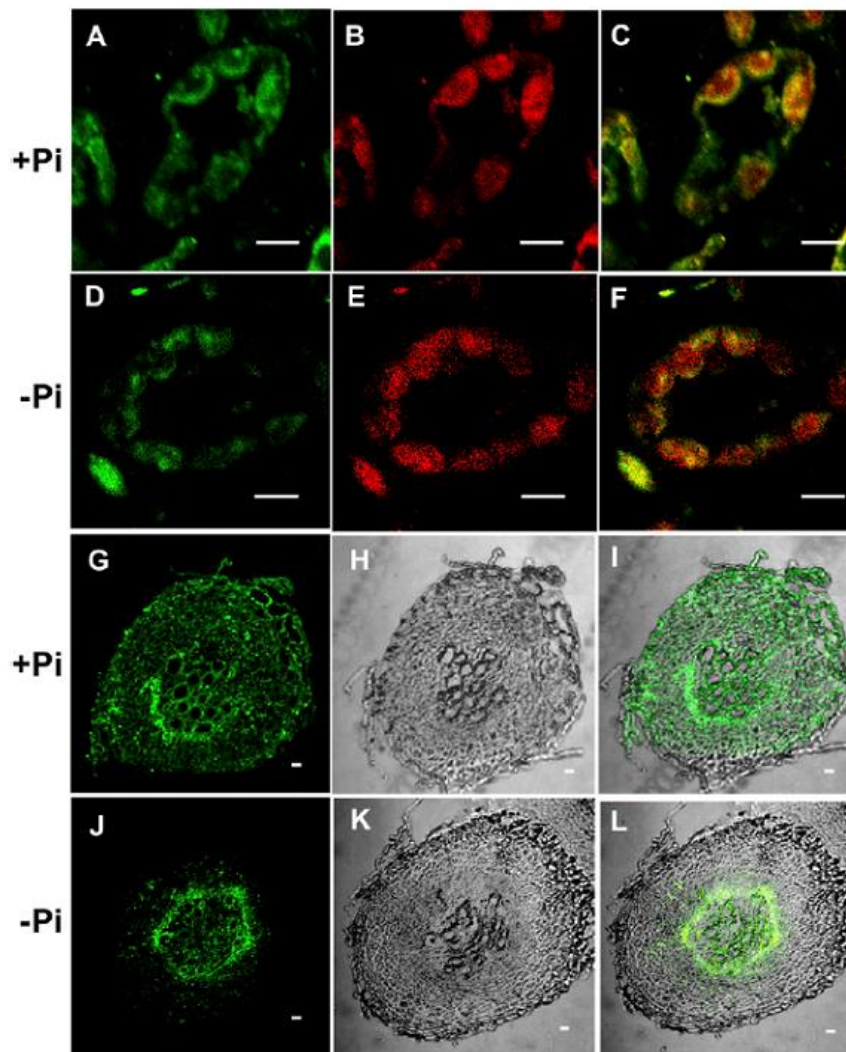


Figura 19. Localización de las subunidades α de las SnRK1 en hoja y raíz. Cortes de hoja (A-F) y de raíz (G-L) en suficiencia (+Pi) o deficiencia nutrimental (-Pi) se fijaron e incubaron, según lo descrito en materiales y métodos, con anti- α como primer anticuerpo y como segundo anticuerpo el anti-conejo conjugado con el fluorocromo Alexa 568. La inmunolocalización se muestra como la fluorescencia en verde de Alexa 568 en hojas (A y D) y en raíces (G y J) B y E muestran la auto fluorescencia de la clorofila en rojo, C y F son imágenes de la superposición de la auto fluorescencia de la clorofila y de la fluorescencia por Alexa 568, H y K son imágenes en campo brillante de los cortes transversales de raíz y finalmente, I y L muestran la superposición de las imágenes de fluorescencia por Alexa 568 y del campo brillante. Las barras representan 10 μm .

5.4 Efecto de la deficiencia de fosfato sobre las plantas transgénicas que sobreexpresan las subunidades catalíticas fusionadas con la GFP

5.4.1 Actividad de SnRK1

Para evaluar el efecto que tiene la deficiencia de fosfato sobre la actividad de SnRK1 en las plantas transgénicas que sobreexpresan la GFP, AKIN10-GFP y AKIN11-GFP, se evaluó la actividad en condiciones de suficiencia o de deficiencia de fosfato por diez días. Los resultados (figura 20) muestran que las plantas que sólo sobreexpresan GFP y las que sobreexpresan GFP en fusión con AKIN11 tienen los mismos niveles de actividad que el control, es decir que se comportan prácticamente como el tipo silvestre, esto se podría explicar en la transgénica AKIN11-GFP si consideramos una cantidad menor de las subunidades α del complejo SnRK1 durante la deficiencia de Pi, como lo sugieren las microscopías por inmunolocalización. Sin embargo, las transgénicas AKIN10-GFP presentan un incremento notable de la actividad durante la deficiencia de fosfato, esto conduce a pensar en la posibilidad de que la proteína que esté disminuyendo en cantidad en esa condición es AKIN11 y que esto esté repercutiendo en una baja en la actividad SnRK1 de las plantas AKIN11-GFP, lo que además significaría que AKIN10 es la subunidad que forma parte del complejo SnRK1 activo durante la deficiencia de Pi y por eso se observan niveles de actividad prácticamente de tipo silvestre y explicaría también el aumento de actividad SnRK1 en las AKIN10-GFP.

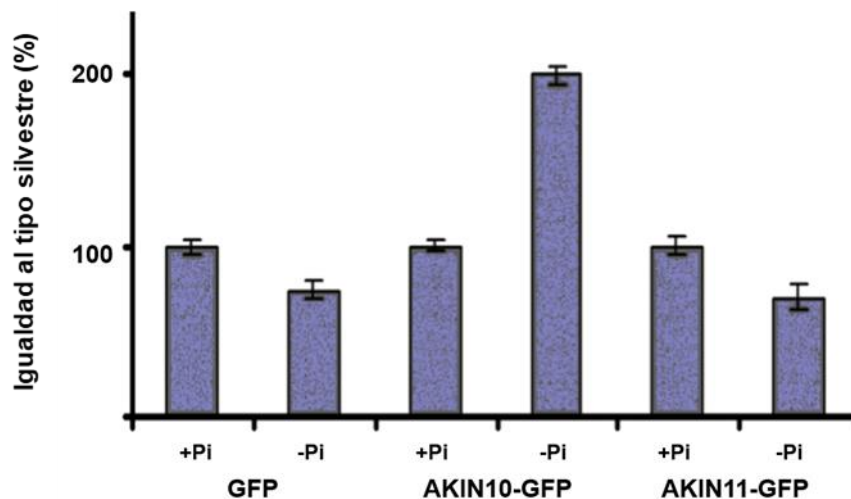


Figura 20 **Actividad de plantas transgénicas que sobreexpresan las subunidades catalíticas.** La actividad se evaluó como fosforilación del péptido SAMS en rosetas de *Arabidopsis* a los 10 días de deficiencia de fosfato y se reporta como porcentaje de igualdad respecto al tipo silvestre (control). Las barras representan las medias \pm la desviación estándar (n=3).

5.4.2 Expresión de AKIN10 y AKIN11

Para explorar un poco más que era lo que sucedía con AKIN10 y AKIN11 durante la deficiencia de Pi, se observó por microscopía confocal a las transgénicas de AKIN10-GFP y AKIN11-GFP durante condiciones de suficiencia nutrimental (+Pi) y de deficiencia de Pi (-Pi). Los resultados fueron consistentes respecto a la localización mayoritariamente cloroplástica de ambas proteínas de fusión; sin embargo, mientras la fluorescencia se mantuvo igual tanto en deficiencia como en suficiencia de Pi en las plantas AKIN10, la fluorescencia de AKIN11-GFP prácticamente desapareció durante la deficiencia de fósforo (figura 21), este hallazgo sumado al anterior de no encontrar diferencias en la actividad de SnRK1 durante la deficiencia de Pi en la transgénica AKIN11-GFP hace más certera la suposición de que la cantidad de AKIN11 disminuye durante la deficiencia de Pi.

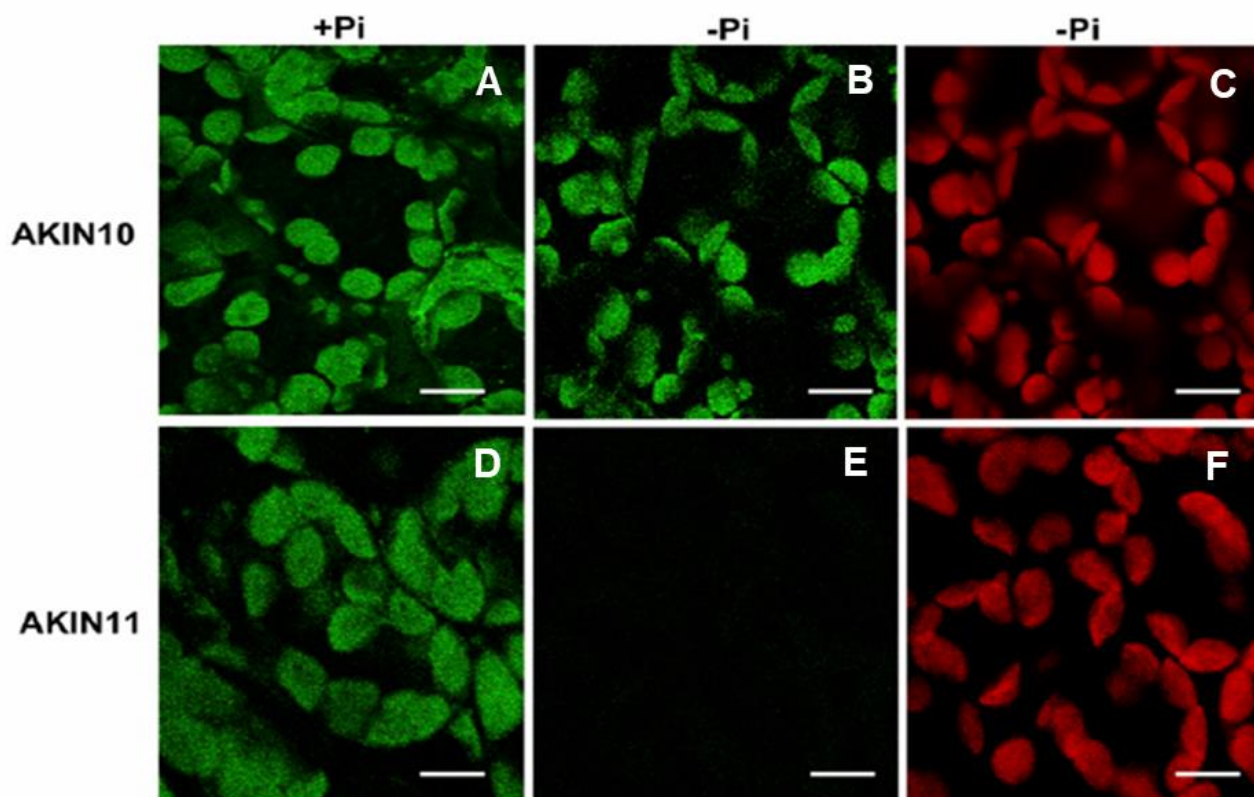


Figura 21. Disminución de AKIN11 durante la deficiencia de fósforo. Cortes de roseta de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan AKIN10-GFP (A, B, C) o AKIN11-GFP (D, E, F), crecidas en suficiencia (+Pi) o deficiencia de Pi (-Pi) se observaron por microscopía confocal. A y D muestran la localización cloroplástica de AKIN10 y AKIN 11 vista a través de la fluorescencia de la GFP. B y C son los mismos campos de observación de muestras de plantas AKIN10-GFP vistos en B como la fluorescencia de la GFP y en C como la autofluorescencia de la clorofila en rojo. E y F son los mismos campos de observación de muestras de plantas transgénicas AKIN11-GFP vistos en E como la fluorescencia de la GFP y en C como la autofluorescencia de la clorofila en rojo.

Se hizo un inmunoblot utilizando extractos proteicos de plantas que sobreexpresaban AKIN10-GFP y AKIN11-GFP utilizando un anticuerpo anti-GFP (figura 22). Los resultados indicaron que, mientras AKIN10 se encontraba presente en la misma proporción en ambas condiciones nutrimentales, la proteína AKIN11 se reducía notablemente durante la deficiencia de Pi (Fig. 22 A y B) además, la imagen muestra otras bandas en el carril correspondiente a las proteínas extraídas de las plantas AKIN11-GFP durante la deficiencia de Pi lo que pudiera representar productos de degradación de AKIN11-GFP. Por otro lado, se esperaba que el incremento de actividad SnRK1 que se presentaba durante la deficiencia de fósforo en las transgénicas AKIN10-GFP se explicara por una diferencia en la activación por fosforilación de la subunidad catalítica, sin embargo, esto no resultó así ya que durante ambas condiciones nutrimentales estaba fosforilada en igual proporción (Fig. 22 C).

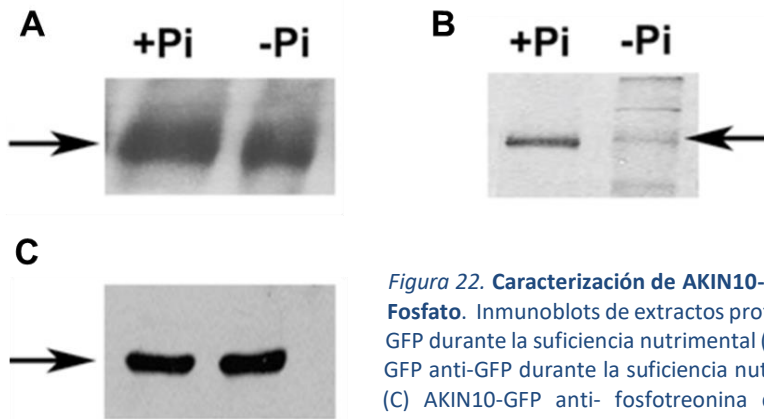


Figura 22. Caracterización de AKIN10-GFP y AKIN11-GFP durante la deficiencia de Fósforo. Inmunoblots de extractos proteicos totales de plantas (A) AKIN10-GFP anti-GFP durante la suficiencia nutrimental (+Pi) o deficiencia de fósforo (-Pi), (B) AKIN11-GFP anti-GFP durante la suficiencia nutrimental (+Pi) o deficiencia de fósforo (-Pi) y (C) AKIN10-GFP anti- fosfotreonina durante la suficiencia nutrimental (+Pi) o deficiencia de fósforo (-Pi). Las flechas señalan la banda esperada.

5.5 Acumulación de almidón en la mutante

Una característica de las plantas sometidas a la deficiencia de fósforo es la acumulación de almidón (Lu *et al.*, 2017)) y debido a que es una molécula que puede almacenar energía se pensó que dicha acumulación podría ser regulada de alguna manera por las SnRK1, es por eso que se analizó la acumulación de almidón en la mutante *akin10*. Se encontró que la mutante *akin10* acumula más almidón respecto al tipo silvestre, esta diferencia no se observa en condiciones de suficiencia nutrimental (figura 23), pero se acentúa en la deficiencia de fósforo, llegando a acumular cerca del doble de almidón de lo que acumula en condiciones de suficiencia. Esta acumulación parece deberse a la disminución en la degradación de almidón durante la deficiencia de fósforo, según se puede observar en la figura 24, en dónde, al medir la marca removida después de un periodo de oscuridad, es evidente que la mutante remueve menos marca respecto al tipo silvestre.

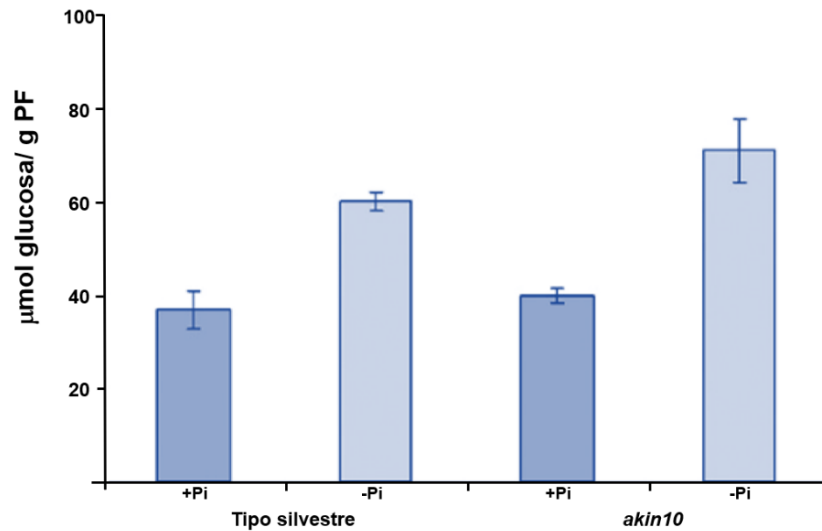
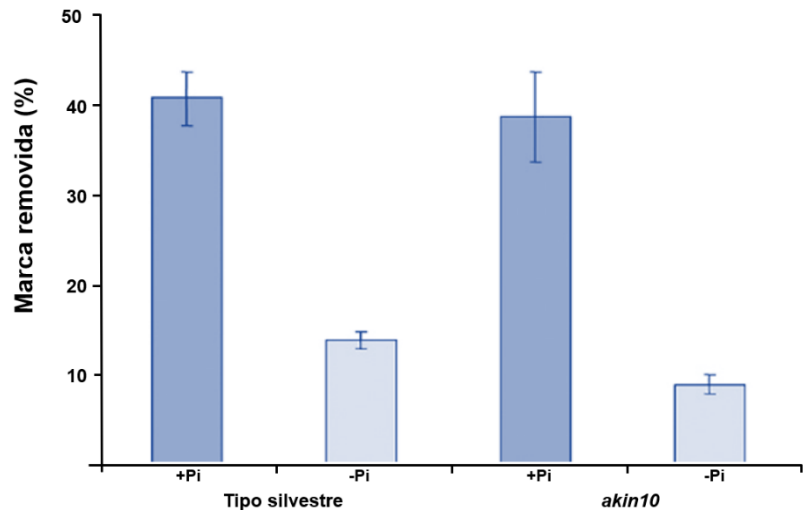


Figura 23. Acumulación de almidón en el tipo silvestre y el mutante *akin10*. Se evaluó el contenido de almidón en plantas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre o mutantes *akin10* sometidas a 3 semanas de deficiencia de fósforo. Las barras representan las medias \pm desviación estándar (n=5) las diferencias entre el tipo silvestre y el mutante durante la deficiencia de fósforo se analizaron con una prueba ANOVA con un α de 0.05 (p=0.02).

Figura 24. Movilización de almidón durante la deficiencia de Pi en las plantas tipo silvestre y mutante *akin10*. Se incubaron las plantas de *Arabidopsis* con [C^{14}]- CO_2 y se midió la cantidad de marca incorporada en los gránulos al final del día y de la noche. Las barras representan las medias \pm desviación estándar (n=5). Las diferencias entre el tipo silvestre y el mutante durante la deficiencia de fósforo se analizaron con una prueba ANOVA con un α de 0.05 (p=0.003).



5.6 Afectación en la expresión de otros genes durante la deficiencia de fósforo

Para analizar la influencia de AKIN10 en la expresión de otros genes, se analizaron microarreglos de *Arabidopsis* hibridados con RNA proveniente de plantas tipo silvestre o de mutantes *akin10*, sometidas a deficiencia de fósforo. De acuerdo con la lista de genes que modifican su expresión en 1.5 veces, y debido a la posible relación de SnRK1 con el metabolismo de carbohidratos y la señalización durante el estrés se eligieron los genes de la tabla 5 para su comprobación mediante RT-PCR:

Tabla 5. Genes elegidos para corroborar una expresión diferencial durante la deficiencia de fosfato en plantas mutantes *akin10*. Los genes a la izquierda están involucrados en el metabolismo del carbono mientras que los de la derecha en la señalización durante el estrés en general

Genes que se expresan hacia arriba en la mutante durante la deficiencia de fosfato		Genes que se expresan hacia abajo en la mutante durante la deficiencia de fosfato	
Siglas	Nombre	Siglas	Nombre
SPS4	Sacarosa fosfato sintasa 4	SKP5	Factor 5 interactuante con SKP1
SPS2	Sacarosa fosfato sintasa 2	CP	Proteinasa de Cisteína
THF1	Formación de tilacoides 1	NPH	Respuesta fototrófica
GAL1	Galactocinasa 1	TMT2	Transportador de Hexosa 2
HEX1	Hexocinasa 1	FBP	Proteína de la Caja F
		RAB	Proteína de unión relacionada con RAB

Los resultados comprueban que la expresión en el mutante está abatida (figura 25 A) o aumentada (figura 25 B) respecto al tipo silvestre en condiciones de deficiencia de Pi, esto nos habla de que AKIN10 estaría participando en la regulación de su expresión, ya sea induciéndola o reprimiéndola.

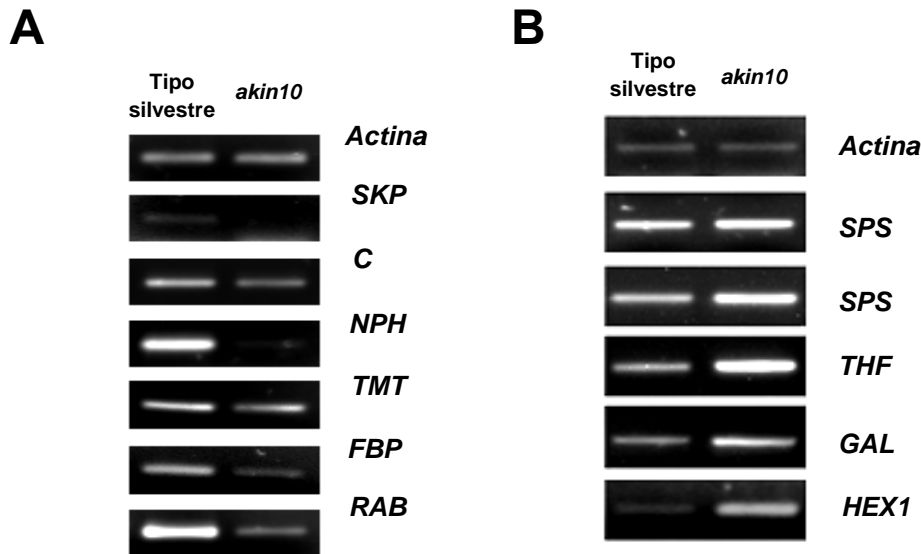


Figura 25. Expresión diferencial de genes en la mutante *akin10* durante la deficiencia de fosfato. Se obtuvo RNA de plantas *akin10* y tipo silvestre, y se analizó por RT-PCR la expresión de los genes indicados en (A) los que disminuyen su expresión en el mutante y en (B) los que la aumentan. Los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar la región codificante de los genes indicados y están contenidos en la tabla 3, n=5.

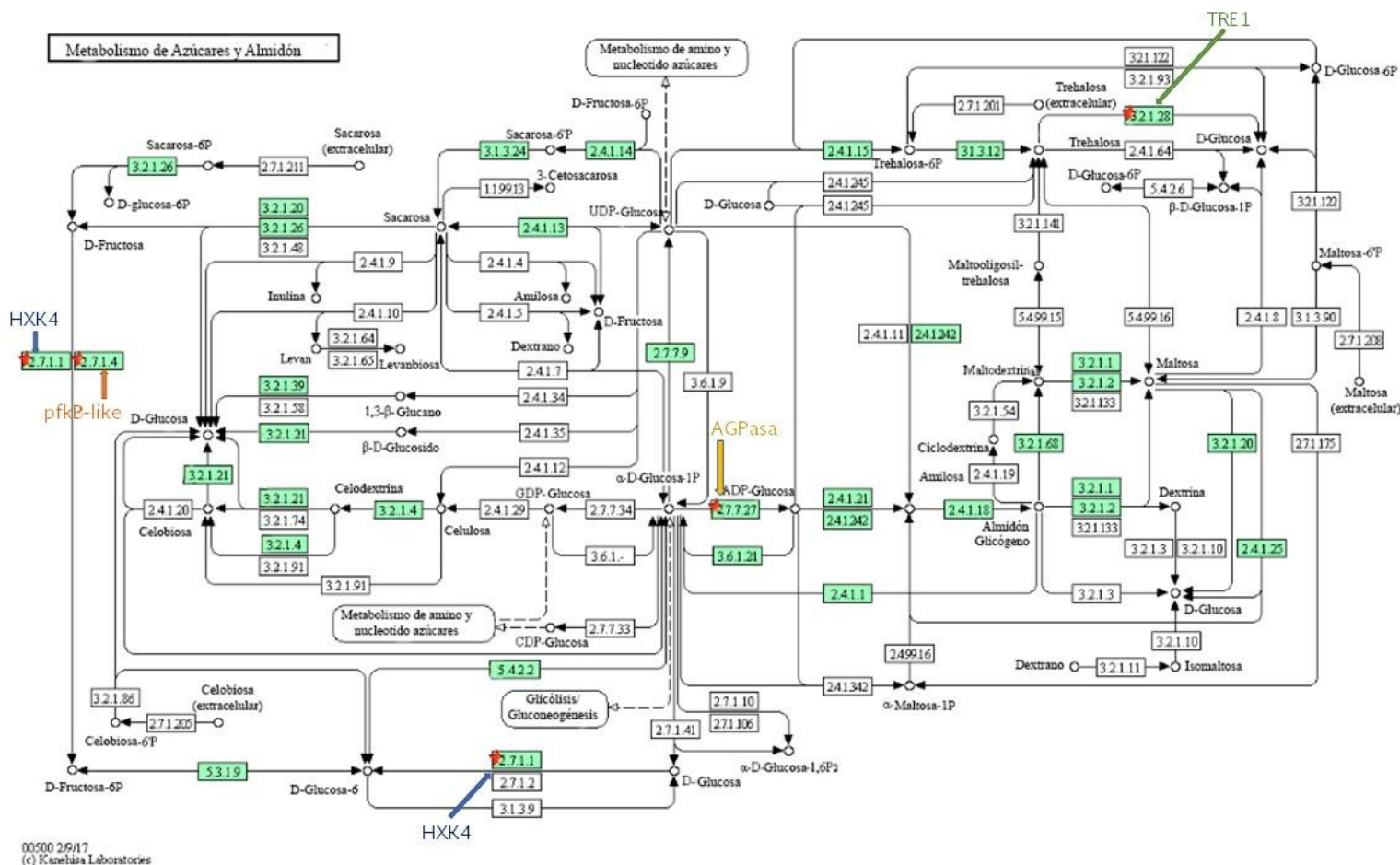


Figura 26. Genes que modifican su expresión en la mutante *akin10*. Se presenta un diagrama KEGG del metabolismo de azúcares y almidón obtenido con el programa de análisis de microarreglos DAVID (Huang *et al.*, 2009^{a,b}), en el que se representa a las enzimas de la vía en recuadros, aquellos en verde son aquellas enzimas cuyos genes codificantes modificaron su expresión en la mutante *akin10* durante la deficiencia de fosfato respecto al tipo silvestre, las estrellas rojas sobre algunos de estos recuadros indican los genes que la modificaron hacia abajo en 1.5 veces y corresponden a 2.7.1.1 Hexocinasa (ATHXK4), 2.7.1.4 Proteína de la familia de las cinasas de carbohidratos pfkB-like, 2.7.7.27 ADP glucosa pirofosforilasa (AGPasa), 3.2.1.28 Trehalasa 1 (TRE1).

Los microarreglos se analizaron con el programa de análisis DAVID (Huang *et al.*, 2009^{a,b}), lo que permitió observar aquellos genes que abatieron su expresión en la mutante *akin10*, en 1.5 veces, y que estarían siendo regulados positivamente por AKIN10. Se encontró que la mutación tiene impacto en varias vías metabólicas en particular se muestra el metabolismo de azúcares y almidón (figura 26). Entre los genes con la expresión abatida en la mutante *akin10*, en el metabolismo de azúcares y almidón, sobresale el gen que codifica para hexocinasa ya que esta enzima tiene un papel dual en la detección de los niveles de glucosa y en la fosforilación de esta (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017). En esta mutante también disminuye la acumulación de los transcritos para trehalasa y para la ADP glucosa pirofosforilasa (AGPasa) sugiriendo que AKIN10 podría estar implicada en la regulación de la síntesis del almidón y en la degradación de trehalosa.

6 Discusión

6.1 Efecto de la deficiencia de fósforo sobre la actividad de SnRK1

La deficiencia de fósforo representa una condición de estrés nutricional que afecta la capacidad de las plantas de crecer y desarrollarse en forma correcta (Coello *et al.*, 2011) y que impacta negativamente en la productividad vegetal (Chan *et al.*, 2017), es además una condición a la que se ven sometidas la mayoría de las plantas debido a la poca disponibilidad de este macronutriente en los suelos mundiales (Kobae, 2019). Para lidiar con la deficiencia de Pi las plantas desarrollaron mecanismos de respuesta que les permiten absorberlo, utilizarlo o distribuirlo eficientemente, pero para poder responder a tiempo necesitan primero detectar la señal de deficiencia de fósforo y después señalizarla rápidamente. En este sentido es que surge este trabajo en un intento de identificar si las SnRK1 participan en la regulación de algunas de las respuestas que se desencadenan tras la detección de la deficiencia de Pi, particularmente incidiendo en el metabolismo del almidón y en la regulación de la expresión genética durante este estrés.

Las proteínas cinasas de la familia SnRK1 se han descrito como sensores energéticos celulares realizando actividades similares a la AMPK y a la SNF1, sus homólogos en mamíferos y levaduras respectivamente (Crozet *et al.*, 2014). En este trabajo se sometió a plantas de *Arabidopsis* a deficiencia de Pi con la consecuente baja de su capacidad energética y se investigó si existían cambios en la expresión de las subunidades catalíticas de SnRK1 AKIN10 y AKIN11. Los resultados mostraron que la abundancia de los transcritos que codifican para dichas subunidades catalíticas no se modifica debido a la deficiencia energética derivada de la deficiencia de Pi (figura 9), algo esperado considerando que en el 2007 Baena-González y sus colaboradores propusieron que la expresión de las subunidades catalíticas AKIN10 y AKIN11 de SnRK1 en hojas es constitutiva; por lo que si era cierto que las SnRK1 incidían sobre las respuestas a la deficiencia de fósforo tendrían que ser ambas subunidades o existe la posibilidad de regulación a nivel postranscripcional ya que en estudios de fusión transcripcional entre el promotor de AKIN10 y la región codificante para la β -glucuronidasa se ha observado que AKIN10 se expresa a lo largo de todo el desarrollo, principalmente en tejido vascular y meristemático, y que en el caso de AKIN11 con experimentos similares, se restringe a embriones, silicuas, semillas y flor (Broeckx *et al.*, 2016). No existe un

estudio en donde se determine la abundancia de cada una de las subunidades, pero mediante experimentos bioquímicos de inmunoprecipitación se descubrió que la actividad asociada a la subunidad AKIN10 representa alrededor del 80% de la actividad soluble total (Jossier *et al.*, 2009), por lo que sí es posible una regulación diferencial sobre las subunidades catalíticas. En este sentido es que se consiguió y caracterizó la mutante por inserción de T-DNA *akin10* (figuras 10, 11 y 14), para obtener más información sobre el papel de esta subunidad durante la deficiencia de Pi. La actividad de SnRK1 de *akin10* en condiciones de suficiencia nutrimental es la misma que el tipo silvestre mientras que durante la deficiencia de Pi la actividad disminuye ligeramente respecto al control a los 5 días y esta disminución se hace significativa a los 10 días del tratamiento (figura 15), lo que sugiere que AKIN10 es la subunidad activa durante la deficiencia de Pi.

La siguiente aproximación para poder determinar cuál de las dos subunidades estaría formando parte del complejo activo durante la deficiencia de Pi, consistió en generar plantas transgénicas que sobreexpresaran AKIN10 o AKIN11 fusionadas a la proteína verde fluorescente (figura 16). Durante la deficiencia de Pi las plantas que sobreexpresaban AKIN11-GFP mantenían los niveles de actividad de SnRK1 que tiene el tipo silvestre tanto en suficiencia como deficiencia de Pi (figura 20), estos resultados sumados a que se había observado en la inmunolocalización (figura 19) una disminución en la señal que podría deberse a un abatimiento en la cantidad de la proteína durante la deficiencia de fosfato, sugerían que la proteína que estaba disminuyendo durante esta condición era AKIN11, y que la razón de su disminución no estaba afectando a AKIN10 durante la deficiencia de Pi ya que la transgénica AKIN10-GFP incrementó la actividad de SnRK1 en prácticamente el 100% respecto al control. Además, al observar al microscopio confocal las plantas transgénicas AKIN10-GFP y AKIN11-GFP se observó que la fluorescencia de GFP en las plantas AKIN11-GFP durante la deficiencia de Pi prácticamente desaparecía (figura 21) lo que confirma que AKIN11 se encuentra abatida durante la deficiencia a deficiencia de fosfato, posiblemente debido a la degradación de la proteína, esta degradación podría darse vía proteosoma como sucede con la Snf1 (subunidad catalítica de las SNF1 de levaduras) después de ser SUMOilada (Simpson-Lavy y Johnston, 2013). Sobre la degradación de las SnRK1, Elrouby y Coupland, descubrieron en 2001, mediante un ensayo de doble híbrido, que AKIN10 interactúa con la enzima conjugante de SUMO E2 y con la proteasa ESD4, y mediante ensayos de alto rendimiento en *E. coli*, observaron que AKIN10 es SUMOilada con las isoformas

SUMO1 y SUMO3. Crozet y colaboradores en 2016 demostraron que el complejo SnRK1, formado con AKIN10, es SUMOilado por la ligasa SUMO SIZ1 E3, lo que resulta en su ubiquitinación y degradación vía proteasoma. Además, Lu *et al.*, 2016 encontró que AKIN11 se acumula en el proteoma de la mutante nula *ask1*; ASK1 funciona como una subunidad de SKP1-CUL1-F-box (SCF) E3 ligasa de ubiquitina, por lo que los autores postulan que AKIN11 sería degradada vía proteasoma después de ser ubiquitinada. Resulta interesante que tanto AKIN10 como AKIN11 interactúan con la subunidad SKP1/ASK1 y que SnRK1 participa en el ensamblaje del complejo proteosómico con esta ligasa (Farras *et al.*, 2001), en este mismo estudio se reportó que SnRK1 interactúa con la subunidad α 4/PAD 1 del proteosoma 20S lo que favorece la formación de un complejo trimérico SKP1/ASK1 *in vitro*, este hallazgo sugiere que SnRK1 participaría también en la fosforilación necesaria para la degradación de proteínas, muy probablemente incluyéndose a sí misma. Se ha demostrado que algunas enzimas que regulan la conjugación o desconjugación de ubiquitina (Ub) están involucradas en el control de las respuestas adaptativas a la deficiencia de Pi en plantas, dentro de las que se encuentran las E3 Ub ligasas y las Ub desconjugasas (Rojas-Triana *et al.*, 2013). Independientemente de que las subunidades catalíticas de las SnRK1 estén asociadas a complejos proteosómicos, es probable que la regulación negativa de la subunidad AKIN11 esté asociada con el mecanismo de señalización durante la deficiencia de Pi. Se deben realizar experimentos adicionales para determinar cuál es la importancia de la degradación de esta subunidad durante la señalización por falta de Pi y si esto ocurre también en respuesta a deficiencia de otros nutrientes.

Ya que los resultados obtenidos sugieren que el complejo activo durante la deficiencia de Pi contiene AKIN10 como subunidad α y por lo tanto la responsable de la actividad SnRK1 durante esa condición, se esperaba que hubiera alguna diferencia en el estado de activación por fosforilación de la Thr¹⁷⁵ puesto que se ha demostrado que para estar activa la subunidad catalítica debe estar fosforilada en ese el T-loop de activación (Sugden *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2013) pero no se observaron diferencias en la fosforilación de AKIN10 cuando las plantas estaban creciendo en condiciones de deficiencia y suficiencia energética (figura 14), por lo que el incremento en actividad no puede ser explicado por este fenómeno, aunque el inmunoblot no es tan fino como para descartar pequeños cambios en el estado de fosforilación como encontraron Rodrigues y colaboradores (2013) cuando demostraron que la PP2C defosforila e inactiva *in vitro* e *in vivo* a AKIN10, pero no pudieron observar

cambios en el estado de fosforilación de la enzima entre las condiciones que inducen o inactivan a SnRK10 mediante un inmunoblot con el anti- α . Por otro lado, datos recientes en el laboratorio indican que otros sitios de fosforilación podrían estar influyendo en la actividad de SnRK1 y la identificación de esos sitios se encuentra en curso. Otra explicación para el aumento de actividad de AKIN10 es que esté asociándose con distintas subunidades reguladoras durante la deficiencia de Pi y que estos complejos tengan diferencias en actividad. Esta situación se ha caracterizado en células de mamíferos, en donde la subunidad γ_1 , asociada con α_1 o α_2 forma complejos con mayor actividad que con cualquiera de las otras dos subunidades gamma (Cheung *et al*, 2000), lo que indica que la composición del complejo regula su actividad.

La baja actividad de cinasa SnRK1 observada extractos obtenidos de plantas de tipo silvestre creciendo en deficiencia de Pi se debe a la presencia de algún inhibidor del complejo, ya que en experimentos posteriores utilizando proteínas fraccionadas por filtración en gel, la actividad de SnRK1 obtenida de plantas en este estrés era mayor que cuando están en suficiencia nutrimental, lo que resulta más acorde con su papel de sensor energético (Guerrero-Garzón, 2013), esto explicaría también el aumento de actividad que se observa en las plantas transgénicas AKIN10-GFP durante la deficiencia de Pi, ya que al haber mayor cantidad de proteína el efecto del inhibidor que está presente en los extractos se ve disminuido y se puede observar el incremento de actividad.

Estos resultados sugieren que las plantas de *Arabidopsis* que crecen en suficiencia de Pi forman complejos con ambas subunidades y cuando las plantas son transferidas a deficiencia de Pi, AKIN11 es degradada por lo que él, o los, complejos dominantes estarían formados con AKIN10 y serían importantes para regular algunos cambios metabólicos.

6.2 Localización de AKIN10 y AKIN11

Las construcciones diseñadas para producir las plantas transgénicas que sobreexpresan AKIN10 o AKIN11, tenían el DNA codificante de alguna de las dos en fusión con la proteína verde fluorescente por lo que se pudo observar mediante microscopia confocal (figura 17) que la localización de ambas subunidades es principalmente cloroplástica, aunque se puede observar también en menor medida

en el citoplasma. Recientemente, otro grupo de investigación encontró que la subunidad catalítica AKIN11 se encuentra en el cloroplasto, confirmando nuestros resultados (Wang et al., 2019). Adicionalmente, Ávila-Castañeda encontró de que tanto AKIN10 como AKIN $\beta\gamma$ se localizan en el cloroplasto (Ávila-Castañeda et al., 2014), por lo que AKIN $\beta\gamma$ podría formar parte del dímero o trímero activo de SNRK1. Ambas subunidades catalíticas han sido asociadas también al núcleo en donde tendrían un papel directo en la regulación de factores transcripcionales para la expresión de genes (Broeckx et al., 2016). Además, la ubicación de estas subunidades dentro del citoplasma está asociada al retículo endoplásmico. Al perturbarse las condiciones del cloroplasto, la localización dentro del citoplasma cambia, lo que soporta su papel de sensor energético (Blanco et al., 2019).

6.3 AKIN10 participa en la degradación de Almidón

Se sabe que durante la deficiencia de Pi las plantas acumulan almidón (Lu et al., 2017) y esto ha sido relacionado con una disminución en su degradación (Bernal et al., 2005), este efecto se observó lo en las plantas analizadas de *Arabidopsis* tipo silvestre durante la deficiencia de fosfato, y se ve aumentado en la mutante puesto que acumula más almidón respecto al tipo silvestre (figura 23). También se encontró que las plantas mutantes *akin10* movilizan menos almidón durante la noche en condiciones de deficiencia de Pi respecto al control (figura 24) lo que se traduciría como que en la mutante la degradación es significativamente menor. Estos hallazgos sumados a que Baena-González et al., en el 2007, demostraron que plantas de *Arabidopsis* con un silenciamiento transitorio de *akin11* y *akin10*, no movilizan el almidón durante la noche, sugieren que AKIN10 estaría involucrada en la degradación de almidón.

Aunque la regulación de las enzimas que participan en la degradación del almidón no está completamente entendida, y la importancia de la fosforilación en su actividad no ha sido investigada, existe evidencia de que las enzimas esenciales para la degradación de este metabolito como la GWD, la PWD, la DPE1 y la DPE2 se encuentran fosforiladas *in vivo* (PhosPhAt), esta última resulta interesante puesto que está involucrada en el metabolismo de la maltosa relacionada con el almidón durante la degradación del mismo (Chia et al., 2004; Fettke et al., 2006) y dado que la maltosa estimula la actividad de SnRK1 podría existir un mecanismo de regulación en donde la cinasa fosforile y estimule la actividad de esta enzima puesto que Ruiz-Gayosso et al., (2018)

encontraron evidencia de que la DPE2 es fosforilada y activada por SnRK1, lo que podría promover el flujo de carbono durante la noche.

La otra posibilidad que existe derivada de considerar que la localización es cloroplástica es que SnRK1 esté interactuando directamente con el almidón, puesto que la subunidad AKIN $\beta\gamma$, que es aceptada como la subunidad gamma en el complejo SnRK1 (Ramon *et al.*, 2013, Emanuelle *et al.*, 2015), tiene un motivo de unión a carbohidratos (CBM, Carbohydrate Binding Domain), conservado en AMPK β 1, capaz de unir glucógeno, percibiendo así el estado energético de la célula (McBride *et al.*, 2009). Dado que la localización de AKIN $\beta\gamma$ es cloroplástica y que la unión de almidón inhibe la actividad de SnRK1 (Ávila *et al.*, 2014) es posible sugerir que las SnRK1 regulan el metabolismo del almidón al unirse directamente con él, aunque el mecanismo tendrá que ser dilucidado en posteriores investigaciones.

6.4 Las SnRK1 participan en la regulación de la expresión genética durante la deficiencia de fosfato

A las SnRK1 se les ha asignado un papel central en la regulación del transcriptoma en diferentes situaciones de estrés (Baena-González *et al.*, 2007; Baena-González y Sheen, 2008) y condiciones metabólicas, específicamente siendo un intermediario de la señalización energética intracelular (Wurzinger *et al.*, 2018). La caracterización de la mutante *akin10* proporcionó evidencia del papel que tiene SnRK1 como regulador del transcriptoma bajo estrés por deficiencia de Pi. Por medio de RT-PCR se observó la inducción en la mutante de genes involucrados en la síntesis de sacarosa (*SPS4* y *SPS29*), metabolismo de azúcares (*GAL1* y *HEX1*) y formación de tilacoides (*THF1*). Al estar inducidos en la mutante, se puede afirmar que estarían siendo regulados negativamente en el tipo silvestre durante la deficiencia de Pi. De manera contrastante, la *HX4* es regulada positivamente por AKIN10, este resultado sugiere que la regulación sobre genes involucrados en el metabolismo del carbono es bastante específica; finalmente otros genes involucrados en la respuesta general al estrés fueron regulados positivamente.

La participación de las SnRKs en la acumulación del almidón se ha descrito para arroz (Kanegae *et al.*, 2005), *Arabidopsis* (Fragoso *et al.*, 2009), papa (McKibbin *et al.*, 2006) y jitomate (Wang *et al.*, 2012), esta acumulación podría deberse a una menor degradación o a una mayor síntesis. Ya se discutió el posible papel de AKIN10 durante la degradación, pero al parecer también tendría implicaciones en la síntesis pues de acuerdo con los resultados del microarreglo, la *AGPasa* estaría siendo regulada por AKIN10 durante la deficiencia de fósforo, este hallazgo fue confirmado recientemente en un estudio sobre camote (*Ipomoea batatas*) en donde los investigadores encontraron que tanto el gen que codifica para la *AGPasa* como la actividad de la enzima, se encuentran incrementados en las raíces de almacenamiento del camote de plantas transgénicas que sobreexpresan SnRK1 respecto a las tipo silvestre (Ren *et al.*, 2019). Los resultados y datos de la literatura sugieren entonces que las SnRK1 estarían participando tanto en la síntesis como en la degradación del almidón, situación interesante porque el que esté actuando sobre una u otra vía dependería de tejidos, desarrollo y condiciones de crecimiento (Ruiz-Gayosso *et al.*, 2018).

7 Conclusiones

La localización subcelular de las subunidades catalíticas AKIN10 y AKIN11 en las condiciones evaluadas es primordialmente cloroplástica, aunque se observa también en citoplasma.

AKIN11 se degrada en forma específica durante la deficiencia de fosfato

Las subunidades catalíticas AKIN10 y AKIN11 de las SnRK1 participan en la degradación de almidón y la regulación de la expresión genética durante la deficiencia de Pi.

8 Perspectivas

Determinar si la degradación de AKIN11 durante la deficiencia de fosfato es específica ante este estrés y explorar el mecanismo por el cual se degrada.

Dada la evidencia obtenida en nuestro laboratorio en los últimos años, sería importante confirmar que AKIN10 se fosforila en otro residuo, además de la T¹⁷⁵, y que esta fosforilación es necesaria para su función durante la deficiencia de fosfato.

Es evidente que las SnRK1 son cruciales en las respuestas a la deficiencia de fosfato, en particular en la movilización y degradación del almidón, sin embargo, en este trabajo no se llegó a dilucidar el mecanismo.

9 Bibliografía

- Alderson, A., Sabelli, P. A., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Shewry, P. R., Haldford, N. G. (1991) Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc Natl Acad Sci*, *88*, 8602-8605.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C., Ecker, J.R. (2003) Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, *301*, 653-657.
- Aguilera-Alvarado, G.P., Sánchez-Nieto, S. (2017) Plant hexokinases are multifaceted proteins. *Plant Cell Physiol*, *58*, 1151-1160.
- Ávila-Castañeda, A., Gutiérrez-Granados, N., Ruiz-Gayosso, A., Sosa-Peinado, A., Martínez-Barajas, E., Coello, P. (2014) Structural and functional basis for starch binding in the SnRK1 subunits AKIN β 2 and AKIN β 3. *Front Plant Sci*, *5*, 1–9.
- Baba, A.I., Rigó, G., Ayaydin, F., Rehman, N.A., Zsigmond, L., Valkai, I., Urbancsok, J., Vass, I., Pasternak, T., Palme, K., Szabados, L., Csépló. (2018) Functional Analysis of the *Arabidopsis thaliana* CDPK- Related Kinase Family: AtCRK1 Regulates Responses to Continuous Light. *Int J Mol Sci*, *19*, 1282.
- Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., Sheen J. (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signaling. *Nature*, *448*, 938-42.
- Baena-González, E., Sheen, J. (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci*, *13*, 474-82.
- Bateman, A. (1997) The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci*, *22*, 12-13.

- Bayer, R.G., Stael, S., Rocha, A.G., Mair, A., Vothknecht, U.C., Teige, M. (2012) Chloroplast-localized protein kinases: a step forward towards a complete inventory. *J Exp Bot*, 63, 1713–1723.
- Beg, Z. H., Allmann, D. W., Gibson, D. M. 1973. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 54, 1362–1369.
- Bernal Gracida Lilia (2009) Factores involucrados en la degradación de almidón en hojas de plantas de frijol sometidas a estrés por deficiencia de fosfato. Tesis doctoral, posgrado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- Bernal, L., Coello, P., Martínez-Barajas, E. (2005) Possible role of R1 protein on starch accumulation in bean seedling (*Phaseolus vulgaris* L.) under phosphate deficiency. *J Plant Physiol*, 162, 970–976.
- Blanco, N.E., Liebsch, D., Guinea, M., Strand, Å., Whelan, J. (2019) Dual and dynamic intracellular localization of *Arabidopsis thaliana* SnRK1.1. *J Exp Bot*, 70, 2325–2338.
- Boudsocq, M., Sheen, J. (2013) CDPKs in immune and stress signaling. *Trends Plant Sci*, 18, 30-40.
- Boxall, S.F., Dever, L.V., Knerová, J., Gould, P.D., Hartwell, J. (2017) Phosphorylation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Is Essential for Maximal and Sustained Dark CO₂ Fixation and Core Circadian Clock Operation in the Obligate Crassulacean Acid Metabolism Species *Kalanchoë fedtschenkoi*. *Plant Cell*, 29, 2519-2536.
- Broeckx, T., Hulsmans, S., Rolland F. (2016) The plant energy sensor: evolutionary conservation and divergence of SnRK1 structure, regulation, and function. *J Exp Bot* 67, 6215–6252.-
- Burleigh, S.H., Harrison M.J. (1998) Characterization of the Mt4 gene from *Medicago truncatula*. *Gene*, 216, 47-53.
- Camacho, Y., Martínez-Castilla, L., Fragoso, S., Vázquez, S., Martínez-Barajas, E., Coello, P. (2008) Characterization of a type A response regulator in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in response to phosphate starvation. *Physiol Plant*, 132, 272–282.

- Cao, Y., Bojjireddy, N., Kim, N., Li, T., Zhai, P., Nagarajan, N., Sadoshima, J., Palmiter, R.D., Tian, F. (2017) Activation of γ 2-AMPK Suppresses Ribosome Biogenesis and Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circ Res*, 121, 1182-1191.
- Carling, D., Zammit, V.A., Hardie, D.G. (1987) A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett*, 223, 217-222.
- Carlson, C.A., Kim, K.H. (1973) Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 248,378–80.
- Chan, A., Carianopol, C., Tsai, A. Y., Varatharajah, K., Chiu R. S., Gazzarrini, S. (2017). SnRK1 phosphorylation of FUSCA3 positively regulates embryogenesis, seed yield, and plant growth at high temperature in Arabidopsis. *J Exp Bot*, 68, 4219-4231.
- Cheung, P.C., Salt IP, Davies S.P., Hardie D.G., Carling, D. (2000) Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J*, 346, 659–669.
- Chia, T., Thorneycroft, D., Chapple, A., Messerli G, Chen J, Zeeman SC, (2004) A cytosolic glucosyltransferase is required for conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. *Plant J*,37, 853–863.
- Chiou, T.J., Aung K., Lin, S.I., Wu, C.C., Chiang, S.F., Su, C.L. (2006) Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in Arabidopsis. *Plant Cell*, 18, 412–421.
- Cho, H.Y., Wen, T.N., Wang, Y.T., Shih, M.C. (2016) Quantitative phosphoproteomics of protein kinase SnRK1 regulated protein phosphorylation in Arabidopsis under submergence. *J Exp Bot*, 67, 2745-2760.
- Clough, S., Bent A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 16, 735–743.
- Coceti, P., Nicastro, R., Tripodi F. (2018) Conventional and emerging roles of the energy sensor Snf1/AMPK in *Saccharomyces cerevisiae*. *MIC*, 5, 482-494.

- Coello, P., Hey, S.J., Halford, N.G. (2011) The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *J Exp Bot*, 62, 883-93.
- Coello, P., Hirano, E., Hey, S.J., Muttucumar, N., Martínez-Barajas E., Parry M.A.J., Halford, N.G. (2012) Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. *J Exp Bot*, 63, 913-24.
- Crozet, P., Jammes, F., Valot, B., Ambard-Bretteville, F., Nessler, S., Hodges, M., Vidal, J., Thomas, M. (2010) Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* sucrose non fermenting 1-related protein kinase 1 (AtSnRK1) and its activating kinase (AtSnAK) determines their catalytic activities. *J Biol Chem*, 285, 12071–12077.
- Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho C., Adamo M., Elias C.A., Baena-González E. (2014) Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Front Plant Sci*, 20, 5, 190.
- Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho C., Adamo M., Elias C.A., Baena-González E. (2016) SUMOylation represses SnRK1 signaling in *Arabidopsis*. *Plant J*, 85, 120–133.
- Davies, S.P., Carling, D., Hardie, D.G. (1989) Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studies using a specific and sensitive peptide assay. *Eur J Biochem*, 186, 123-128.
- Davies, S.P., Hawley, S.A., Woods, A., Carling, D., Haystead, T.A., Hardie, D.G. (1994) Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur J Biochem*, 223, 351–357.
- Debast, S., Nunes-Nesi, A., Hajirezaei, M.R., Hofmann, J., Sonnewald, U., Fernie, A.R. and Börnke, F. (2011) Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters responsiveness to hormones during sprouting. *Plant Physiol*. 156, 1754–1771.

- De Vit, M.J., Waddle, J.A., Johnston, M. (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell*, 8, 1603-1618.
- Earley, K.W., Haag J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., Pikaard C.S. (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J*, 45, 616–629.
- Elrouby, N., Coupland, G. (2010) Proteome-wide screens for small ubiquitin-like modifier (SUMO) substrates identify Arabidopsis proteins implicated in diverse biological processes. *Proc Natl Acad Sci*, 107, 17415-20.
- Emanuelle, S., Hossain, M.I., Moller, I.E., Pedersen, H.L., van de Meene, A.M., Doblin M.S., Koay A., Oakhill, J.S., Scott, J.W., Willats, W.G., Kemp, B.E., Bacic, A., Gooley, P.R., Stapleton, D.I. (2015) SnRK1 from Arabidopsis thaliana is an atypical AMPK. *Plant J*, 82, 183-92.
- Fang Z.Y., Shao C., Meng Y.J, Wu P., Chen M. (2009) Phosphatate signaling in *Arabidopsis* and *Oryza sativa*. *Plant Sci*, 176, 170-180.
- Fettke, J., Chia, T., Eckermann N., Smith, A.M., Steup, M. (2006) A transglucosidase necessary for starch degradation and maltose metabolism in leaves at night acts on cytosolic heteroglycans (SHG). *Plant J*, 46, 668–684.
- Franco-Zorrilla, J.M., Valli A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M.I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J.A., Paz-Ares, J. (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet*, 39, 1033-7.
- Fragoso, S., Espíndola, L., Páez-Valencia, J., Gamboa, A., Camacho, Y., Martínez-Barajas, E. and Coello, P. (2009) SnRK1 isoforms AKIN10 and AKIN11 are differentially regulated in Arabidopsis plants under phosphate starvation. *Plant Physiol*, 149, 1906– 1916.
- Gissot, L., Polge, C., Bouly, J.P., Lemaitre, T., 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, 747-759.
- Gissot, L., Polge, C., Jossier, M., Girin, T., Bouly, J.P., Kreis, M., Thomas, M. (2006) AKIN betagamma contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiol*, 142, 931-944.

- Glab, N., Oury, C., Guérinier, T., Domenichini, S., Crozet, P., Thomas, M., Vidal, J., Hodges, M. (2017) The impact of *Arabidopsis thaliana* SNF1-related-kinase 1 (SnRK1)-activating kinase 1 (SnAK1) and SnAK2 on SnRK1 phosphorylation status: characterization of a SnAK double mutant. *Plant J*, 89, 1031–1041.
- Gowans, G.J., Hardie, D.G. (2014) AMPK: a cellular energy sensor primarily regulated by AMP. *Biochem Soc Trans*, 42, 71–75.
- Guerrero Garzón, J.F. (2013) Identificación de complejos formados por la snrk1 durante la deficiencia en fósforo en *Arabidopsis thaliana*. Tesis para obtener el título de M en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- Gutiérrez-Luna, F.M., Hernández-Domínguez, E.E., Valencia-Turcotte, L.G., Rodríguez-Sotres, R. (2018) Review: "Pyrophosphate and pyrophosphatases in plants, their involvement in stress responses and their possible relationship to secondary metabolism". *Plant Sci*, 267, 11-19.
- Ham, B.K., Chen, J., Yan, Y., Lucas, W.J. (2018) Insights into plant phosphate sensing and signaling. *Curr Opin Biotechnol*, 49, 1-9.
- Hamburger, D., Rezzonico, E., MacDonald-Comber, Petetot, J., Somerville, C, Poirier, Y. (2002) Identification and characterization of the *Arabidopsis PHO1* gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell*, 14, 889–902.
- Hardie, D.G., Alessi, D.R. (2013). LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biol*, 11, 36.
- Haldford N.G., Hardie D.G. (1998) SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol*, 37, 735-748.
- Harlow, E., Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 53–77
- Harthill, J.E., Meek, S.E., Morrice, N., Peggie, N.W., Borch, J., Wong B.H., Mackintosh C. (2006) Phosphorylation and 14-3-3 binding of *Arabidopsis* trehalose-phosphate syntase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J*, 47, 211-223.

- Hartwell, J., Dever, L.V., Boxall, S.F. (2016). Emerging model systems for functional genomics analysis of Crassulacean acid metabolism. *Curr Opin Plant Biol*, 31,100–108.
- Hedbacker, K., Carlson, M. (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci*, 13, 2408-2420.
- Herzig, S., Shaw, R. (2018) AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 121-135.
- Hey, S.J., Powers, S.J., Beale, M.H., Hawkins N.D., Ward J.L., Halford N.G. (2006) Enhanced seed phytosterol accumulation through expression of a modified HMG-CoA reductase. *Plant Biotechnol J* 4 219–229
- Huang, D.W.^a, Sherman B.T., Lempicki, R.A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nat Protoc*, 4, 44-57.
- Huang, D.W.^b, Sherman, B.T., Lempicki, R.A. (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*, 37, 1-13.
- Huang, T.K., Han, C.L., Lin, S.I., Chen, Y.J., Tsai, Y.C., Chen, Y.R., Chen, J.W., Lin, W.Y., Chen, P.M., Liu, T.Y., Chen, Y.S., Sun, C.M., Chiou, T.J (2013) Identification of downstream components of ubiquitin-conjugating enzyme PHOSPHATE2 by quantitative membrane proteomics in Arabidopsis roots. *Plant Cell*,25, 4044–4060.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu J.K., Harmon, A.C. (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*, 132, 666–680.
- Im, J.H., Cho, Y.H., Kim, G.D., Kang, G.H., Hong, J.W., Yoo, S.D. (2014) Inverse modulation of the energy sensor Snf1-related protein kinase 1 on hypoxia adaptation and salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 37, 2303–2312

- Jaleel, M., Villa, F., Deak, M., Toth, R., Prescott, A.R., Van Aalten, D.M., Alessi, D.R. (2006) The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation. *Biochem J*, 394, 545-55.
- Jiang, R., Carlson, M. (1997) The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol*, 17, 2099–2106.
- Jones, J.B. (1982) Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. *J Plant Nutr*, 5, 1003-1030.
- Kanegae H., Miyoshi K., Hirose T., Tsuchimoto S., Mori M., Nagato Y. and Takano M. (2005) Expressions of rice *sucrose non-fermenting-1 related protein kinase 1* genes are differently regulated during the caryopsis development. *Plant Physiol Biochem*, 43, 669–679.
- Kim, G.D., Cho, Y.H., Yoo, S.D. (2017) Regulatory Functions of Cellular Energy Sensor SNF1-Related Kinase1 for Leaf Senescence Delay through ETHYLENE- INSENSITIVE3 Repression. *Sci Rep*, 9, 3193.
- 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.
- Kobae, Y. (2019) Dynamic phosphate uptake in arbuscular mycorrhizal roots under field conditions. *Front Env Sci*, 6, 159.
- Kruger, N.J., Hammond, J.B.W. (1988) Purification of Immunoglobulins Using Protein A-Sepharose. In: Walker J.M. (eds) *New Protein Techniques. Methods in Molecular Biology™*, vol 3. Humana Press.
- Laurie, S., McKibbin, R.S., Halford, N.G. (2003) Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an alpha-amylase (alpha-Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *J Exp Bot*, 54, 739-47.

- Le, D.T., Nishiyama, R., Watanabe, Y., Mochida, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Tran, L.S. (2011) Genome-wide survey and expression analysis of the plant-specific NAC transcription factor family in soybean during development and dehydration stress. *DNA Res*, 18, 263–276
- Le Roux, M.R., Ward, C.L., Botha F.C., Valentine, A.J. (2006) Routes of pyruvate synthesis in phosphorus-deficient lupin roots and nodules. *New Phytol*, 169, 3399–408.
- Lee, M.J., Yaffe, M.B. (2016) Protein Regulation in Signal Transduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8, a0059.
- Liu, T.Y., Huang T.K., Tseng, C.T., Lai, Y.S., Lin S.I., Lin, W.Y., Chen, J.W., Chiou, T. J. (2012) PHO2-dependent degradation of PHO1 modulates phosphate homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell*, 24, 2168–2183.
- Lu, D., Ni, W., Stanley, B.A., Ma, H. (2016) Proteomics and transcriptomics analyses of Arabidopsis floral buds uncover important functions of ARABIDOPSIS SKP1-LIKE1. *BMC Plant Biol*, 16, 61.
- Lu, S., Li. C., Zhang, Y., Zheng, Z., Liu, D. (2017) Functional Disruption of a chloroplast Pseudouridine Synthase desensitizes *Arabidopsis* plants to phosphate starvation. *Front Plant Sci*, 8, 1421.
- Lumbreras, V., Alba, M.M., Kleinow, T., Koncz C., Pages, M. (2001) Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Rep*, 2, 55–60.
- MacDonald, G. K., Bennett, E. M., Potter, P. A., Ramankutty, N. (2011) Agronomic phosphorus imbalances across the world's croplands. *Proc Natl Acad*, 108, 3086–3091.
- Mahlapuu, M., Johansson C., Lindgren, K., Hjälm, G., Barnes, B.R., Krook, A., Zierath, J.R., Andersson L., Marklund, S. (2004) Expression profiling of the gamma subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma 3 in white skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286, E194–E200.
- Mair, A., Pedrotti, L., Wurzinger, B., Anrather, D., Simeunovic, A., Weiste, C., Valerio, C., Dietrich, K., Kirchler, T., Nägele, T., Carbajosa, J.V., Hanson, J., Baena-González, E., Chaban, C., Weckwerth, W., Dröge-Laser, W., Teige, M. (2015). SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the low-energy response in plants. *eLife*, 11, 4.

- Maya-Bernal, J.L., Ávila, A., Ruiz-Gayosso, A., Trejo-Fregoso, R., Pulido, N., Sosa-Peinado, A., Zuñiga-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/AKINbetagamma-beta3 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 Metab*, 9, 23–34.
- McKibbin R.S., Muttucumar N., Paul M.J., Powers S.J., Burrell M.M., Coates S., Purcell P.C. *et al* (2006) Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnol J*, 4, 409–418.
- Nayak, V., Zhao K., Wyce, A., Schwartz, M.F., Lo, W.S., Berger, SL, Marmorstein, R. (2006) Structure and dimerization of the kinase domain from yeast Snf1, a member of the Snf1/AMPK protein family. *Struct*, 14, 477–485.
- Nielsen, T.H., Rung J.H., Villadsen, D. (2004) Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. *Trends Plant Sci*, 9, 556-63.
- Nukarinen, E., Nägele, T., Pedrotti L., Wurzinger, B., Mair,, A., Landgraf R., Börnke, F., Hanson, J., Teige, M., Baena-Gonzalez, E., Dröge-Laser, W., Weckwerth, W. (2016) Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Sci Rep*, 6, 31697.
- O'Hara, L.E., Paul, M.J., Wingler, A. (2012) How do sugars regulate plant growth and development? New insight into the role of trehalose-6-phosphate. *Mol Plant* 6: 261–274.
- Pant, B.D, Buhtz, A., Kehr, J., Scheible, W.R. (2008) MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J*, 53, 731-738.
- 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, 2804–2821.

- Plaxton, W.C. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Biol*, 47, 185–214.
- Plaxton, W.C., Podestá, F.E., 2006. The Functional Organization and control of Plant Respiration. *Crit Rev Plant Sci*, 25, 159-198.
- Plaxton, W.C., Tran, HT, 2011. Metabolic adaptations to phosphate-starved plants. *Plant Physiol*, 156, 1006-1015.
- Plaxton, W.C. (2004) Plant response to stress: biochemical adaptations to phosphate deficiency. In Encyclopedia of Plant and Crop Science (ed. R. Goodman) pp. 976–980. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Polge, C., Dossier M., Crozet, P., Gissot, L., Thomas, M. (2008) Subunits of the SnRK1 complexes share a common ancestral function together with expression and function specificities; physical interaction with nitrate reductase specifically occurs via AKIN β 1-subunit. *Plant Physiol*, 148, 1570-1582.
- Purcell, P.C., Smith, A.M., Halford, N.G. (1998) Antisense expression of a sucrose nonfermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant J*, 14, 195–202.
- Ramaekers, L., Remans, R., Rao, I.M., Blair, M.W., Vanderleyden, J. (2010) Strategies for improving phosphorus acquisition efficiency of crop plants. *Field Crops Res*, 117, 169–176
- Ramon, M., Ruelens, P., Li Y., Sheen, J., Geuten, K., Rolland, F. (2013) The hybrid four-CBS-domain KIN β subunit functions as the canonical γ subunit of the plant energy sensor SnRK1. *Plant J*, 75, 11-25.
- Raghothama, K.G., (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Biol*, 50, 665–693.
- Ren, Z., He, S., Zhao, N., Zhai, H., & Liu, Q. (2019). A sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1 gene, IbSnRK1, improves starch content, composition, granule size, degree of crystallinity and gelatinization in transgenic sweet potato. *Plant biotechnology journal*, 17, 21–32.

- Richardson, A.E. (2009) Regulating the phosphorus nutrition of plants: molecular biology meeting agronomic needs. *Plan Soil*, 322, 17-24.
- Robertlee, J., Kobayashi, K., Suzuki M., Muranaka, T. (2017) AKIN10, a representative Arabidopsis SNF1-related protein kinase 1 (SnRK1), phosphorylates and downregulates plant HMG-CoA reductase. *FEBS Lett*, 591, 1159-1166.
- Rodriguez, M.C., Petersen, M., Mundy, J. (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 61, 621–649
- Rodrigues, A., Adamo, M., Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Martinho, C., Elias, A., Rabissi, A., Lumberras, V., González-Guzmán, M., Antoni, R., Rodríguez, P.L., Baena-González, E. (2013) ABI1 and PP2CA phosphatases are negative regulators of Snf1-related protein kinase1 signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, 25, 3871-3884.
- Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J.M. (2002) Glucose-sensing and -signaling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res*, 2, 183-201.
- Rojas-Triana, M., Bustos, R., Espinosa-Ruiz, A., Prat, S., Paz-Ares, J., Rubio, V. (2013) Roles of ubiquitination in the control of phosphate starvation responses in plants. *J Integr Plant Biol*, 55, 40–53.
- Rudolph, M.J., Amodeo, G.A., Bai, Y., Tong, L. (2005) Crystal structure of the protein kinase domain of yeast AMP-activated protein kinase Snf1. *Biochem Biophys Res Commun*, 337, 1224–1228.
- Sanz, P., Rubio, T., Garcia-Gimeno, M.A. (2013) AMPK beta subunits: more than just a scaffold in the formation of AMPK complex. *FEBS J*, 280(16): 3723-3733.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron M., Schölkopf, B., Weigel, D., Lohmann, J.U. (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Gen*, 37, 501–506.

- Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, S.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A., Norman, D.G., Hardie, D.G. (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest*, *113*, 274–284.
- Shashkova, S., Welkenhuysen, N., Hohmann, S. (2015) Molecular communication: crosstalk between the Snf1 and other signaling pathways. *FEMS Yeast Res*, *15*, fov026.
- 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*, 996–1005.
- Shin, H., Shin, H.S., Dewbre, G.R., Harrison, M.J. (2004) Phosphate transport in Arabidopsis: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *Plant J*, *39*, 629–642.
- Shin, H., Shin, H.S., Chen, R., Harrison, M.J. (2006) Loss of At4 function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. *Plant J*, *45*, 712–726.
- Shinozawa, A., Otake, R., Takezawa, D. (2019) SnRK2 protein kinases represent an ancient system in plants for adaptation to a terrestrial environment. *Commun Biol*. *2*, 30 .
- Sugden, C., Crawford, R. M., Halford N.G., Hardie, D.G. (1999), Regulation of spinach SNF1-*relatPed* (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.
- Steinberg, G.R., Kemp, B.E. (2009) AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev*, *89*, 1025-1078.
- Simpson-Lavy, K.J., Johnston, M. (2013) SUMOylation regulates the Snf1 protein kinase. *Proc Natl Acad Sci*, *110*, 17432-17437.
- Stone, J. M., Walker J. C. (1995) Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol*, *108*, 451–457.

- Thelander, M., Olsson, T., Ronne, H. (2004) Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *EMBO J*, 23, 1900–1910.
- Thornton, C., Snowden, M.A., Carling, D. (1998) Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in *skeletal* muscle. *J Biol Chem*, 273, 12443–12450.
- Tiessen, A., Prescha, K., Branscheid, A., Palacios, N., McKibbin, R., Halford, N.G., Geigenberger, P. (2003) Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signaling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J*, 35, 490–500.
- Tran, H.T., Qian, W., Hurley, B.A., She, Y.M., Wan D., Plaxton, W.C. (2010) Biochemical and molecular characterization of AtPAP12 and AtPAP26: the predominant purple acid phosphatase secreted by phosphate starved *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 33,1789-1803.
- Tsai, A.Y., Gazzarrini, S. (2012) AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in *Arabidopsis*. *Plant J*, 69, 809–821
- Tsai, A. Y., Gazzarrini, S. (2014). Trehalose-6-phosphate and SnRK1 kinases in plant development and signaling: the emerging picture. *Front Plant Sci*, 5, 119.
- Vance, C.P., Uhde-Stone C., Allan D.L. (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol*, 157,423–447.
- Viola R., Roberts, A.G., Haupt, S., Gazzani, S., Handcock, R.D., Marmioli, N., Machray, G.C., Oparka, K.J. (2001) Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to symplastic phloem unloading. *Plant Cell*, 13, 385–398.
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S, Carlson, M. (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev*, 15, 1104–1114.

- Wang X.L., Peng F.T., Li M.J., Yang L. and Li G.J. (2012) Expression of a heterologous SnRK1 in tomato increases carbon assimilation, nitrogen uptake and modifies fruit development. *J Plant Physiol*, *169*, 1173–1182.
- Wang Y., Wang L., Micallef B.J., Tetlow I.J., Mullen R.T., Feil R., Lunn J.E., Emes M.J. (2019) AKIN β 1, a regulatory subunit of SnRK1, regulates organic acid metabolism and acts as a global regulator of genes involved in carbon, lipid and nitrogen metabolism. *J exp Bot*, *71*, 1010–1028.
- Wu, P., Wang, W., Duan, W., Li, Y., Hou, X. (2017) Comprehensive Analysis of the CDPK-SnRK Superfamily Genes in Chinese Cabbage and Its Evolutionary Implications in Plants. *Front Plant Sci*, *8*, 162.
- Wurzinger, B., Nukarinen, E., Nägele, T., Weckwerth, W., Teige, M. (2018) The SnRK1 kinase as central mediator of energy signaling between different organelles. *Plant Physiol*, *176*, 1085-1094.
- Zeng, X.Q., Chow, W.S., Su, L.J, Peng, X.X., Peng, C.L. (2010) Protective effect of supplemental anthocyanins of Arabidopsis leaves under high light. *Physiol Plant*, *138*, 215-225.
- Zhai^o, Z., Liu, H., Shanklin, J. (2017) Phosphorylation of WRINKLED1 by KIN10 results in its proteasomal degradation, providing a link between energy homeostasis and lipid biosynthesis. *Plant Cell*, *29*, 871–889.
- Ren, Z., He, S., Zhao, N., Zhai, H., & Liu, Q. (2019). A sucrose non-fermenting-1-related protein kinase-1 gene, IbSnRK1, improves starch content, composition, granule size, degree of crystallinity and gelatinization in transgenic sweet potato. *Plant biotechnology journal*, *17*, 21–32.

10 Artículos publicados

SnRK1 Isoforms AKIN10 and AKIN11 Are Differentially Regulated in Arabidopsis Plants under Phosphate Starvation^{1C|IOA}

Selene Frago, Laura Espíndola, Julio Páez-Valencia, Alicia Gamboa, Yolanda Camacho, Eleazar Martínez-Barajas, and Patricia Coello*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química (S.F., L.E., E.M.-B., P.C.), Departamento Ecología Funcional, Instituto de Ecología (J.P.-V., A.G.), and Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular (Y.C.), Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, Distrito Federal 04510

During phosphate starvation, Snf1-related kinase 1 (SnRK1) activity significantly decreases compared with plants growing under normal nutritional conditions. An analysis of the expression of the genes encoding for the catalytic subunits of SnRK1 showed that these subunits were not affected by phosphate starvation. Transgenic Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) plants overexpressing the AKIN10 and AKIN11 catalytic subunits fused with green fluorescent protein (GFP) were produced, and their localizations were mainly chloroplastic with low but detectable signals in the cytoplasm. These data were corroborated with an immunocytochemistry analysis using leaf and root sections with an anti-AKIN10/AKIN11 antibody. The SnRK1 activity in transgenic plants overexpressing AKIN11-GFP was reduced by 35% to 40% in phosphate starvation, in contrast with the results observed in plants overexpressing AKIN10-GFP, which increased the activity by 100%. No differences in activity were observed in plants growing in phosphate-sufficient conditions. Biochemical analysis of the proteins indicated that AKIN11 is specifically degraded under these limited conditions and that the increase in AKIN10-GFP activity was not due to the phosphorylation of threonine-175. These results are consistent with an important role of AKIN10 in signaling during phosphate starvation. Moreover, *akin10* mutant plants were deficient in starch mobilization at night during inorganic phosphate starvation, and under this condition several genes were up-regulated and down-regulated, indicating their important roles in the control of general transcription. This finding reveals novel roles for the different catalytic subunits during phosphate starvation.

Phosphorus (P) is an essential element required for plant growth and development (Bieliski, 1973). The P concentration in soil solutions is high but the assimilable form, inorganic phosphate (Pi), is always in a limiting concentration ranging from 1 to 10 μM (Poirier and Bucher, 2002); thus, plants are frequently growing in Pi-limited conditions. Plants have evolved two broad strategies to cope with limiting Pi: (1) responses designed to increase Pi availability or acquisition, and (2) metabolic adaptations to decrease Pi requirements (Poirier and Bucher, 2002). Processes that lead to enhanced uptake include increased production and

secretion of phosphatases, exudation of organic acids, and greater root growth along with modified root architecture (Bates and Lynch, 1996; Ma et al., 2001; López-Bucio et al., 2002). There are also processes that conserve the use of Pi, such as the remobilization of internal Pi, modifications in carbon metabolism that bypass Pi-requiring steps, and alternative respiratory pathways (Plaxton, 2004). During Pi-limited conditions, a reduction in cytoplasmic Pi, ATP, and ADP directly affects glycolysis, since they are used as cosubstrates of enzymes, such as ATP-dependent phosphofructokinase, NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and pyruvate kinase. However, despite low concentrations of cytosolic Pi and nucleoside phosphates, pyrophosphate (PPI) concentrations remain high and PPI can serve as an energy donor under certain conditions (Duff et al., 1989; Theodorou and Plaxton, 1993). In this situation, in order to continue with the production of carbon skeletons to conserve the carbon flux, several PPI-dependent enzymes are activated, such as UDP-Glc phosphorylase and PPI-dependent phosphofructokinase (Duff et al., 1989; Ciereszko et al., 2001). Another alternative glycolytic pathway known in plants is catalyzed by the action of a nonphosphorylating NADP-dependent

¹ This work was supported by the DGAPA-UNAM (grant no. IN202206), PAIP (grant no. 6290-13), and CONACyT (grant no. 52072). S.F. and L.E. received a scholarship from CONACyT, Mexico.

* Corresponding author; e-mail pcoello@servidor.unam.mx. The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: Patricia Coello (pcoello@servidor.unam.mx).

^{1C|} Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

^{IOA} Open Access articles can be viewed online without a subscription.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.108.133298

LA AMPK Y LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA*

Selene Frago Iñiguez¹ y Patricia Coello Coutiño²

RESUMEN

Debido a la necesidad de mantener la homeostasis energética en los organismos, es una prioridad para los seres vivos el contar con una enzima capaz de evaluar el contenido energético celular. En células animales, la Cinasa Activada por AMP, AMPK (por sus siglas en inglés) es una enzima que regula algunos procesos metabólicos de acuerdo al estado energético; se activa durante el ejercicio, diabetes tipo II, obesidad y anoxia por lo que ha sido propuesta como un regulador metabólico durante condiciones energéticas anormales. Esta enzima es un complejo heterotrimerico que se activa alostéricamente por AMP, sin embargo para su completa activación necesita ser fosforilada por una cinasa río arriba conocida como LKB1. En todos los eucariontes analizados se encuentran complejos ortólogos a AMPK, lo que sugiere una alta conservación funcional en el control metabólico.

PALABRAS CLAVE: AMPK, SnRK1, ATP.

ABSTRACT

Energetic homeostasis is a priority for all the organisms. Therefore, it is very important to have an enzyme capable of evaluating the changes in energetic status. In animal cells, the AMP Activated Kinase (AMPK) is an enzyme that regulates some metabolic pathways according to the energetic status. This enzyme is activated during exercise, type II diabetes, obesity and anoxia, and it has been postulated as a metabolic regulator during abnormal energetic conditions. This enzyme is a heterotrimeric complex that is activated allosterically by AMP; however, for a complete activation, it needs to be phosphorylated by an upstream kinase, LKB1. There have been found orthologs to AMPK in all the eukaryotes analyzed so far, suggesting a high functional conservation in the metabolic control.

KEY WORDS: AMPK, SnRK1, ATP.

INTRODUCCIÓN

¡Vivir resulta a veces tan apremiante! Estamos siempre ocupados en miles de asuntos a la vez que terminamos haciendo las cosas de una manera autónoma, nos enfocamos sólo en lo que nos interesa y hemos perdido la capacidad de observar los detalles de la vida que la hacen tan compleja, pero estas sutilezas pueden resultar sumamente importantes, puesto que si nuestro organismo no funciona adecuadamente sería imposible realizar todo lo que necesitamos hacer día con día. Pero... ¿Quién y cómo se encarga del buen funcionamiento de nuestro organismo?

Para sobrevivir necesitamos energía y ésta se obtiene de nuestro medio am-

biente, sin embargo esto no es suficiente ya que para poder ser utilizada, la energía debe transformarse en el organismo. Los seres heterótrofos oxidan los alimentos a Acetil CoA obteniendo ATP a través del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, mientras que los autótrofos deben transformar la energía solar en ATP para poder utilizarla.

El ATP es una molécula clave en el metabolismo de los seres vivos, se considera universalmente como la "moneda energética de la célula" puesto que al hidrolizar los enlaces fosfato que contiene, se libera una gran cantidad de energía (7.3 Kcal /mol); en promedio un adulto necesita ingerir 2500 Kcal diarias, un mol de glucosa que se asimila en el cuerpo típicamen-

te produce 29 moles de ATP que equivalen a aproximadamente 212 Kcal. De manera que la energía celular puede medirse como el contenido de ATP. Sin embargo éste no es constante y varía de acuerdo a las condiciones fisiológicas, por lo que es necesario un mecanismo que indique cuando hay poco ATP y cuáles son los pasos que el organismo debe seguir para poder mantener su homeostasis energética. Existe una enzima denominada cinasa activada por AMP o AMPK (por sus siglas en inglés, AMP activated Kinase) que se activa cuando disminuye el contenido de ATP y aumenta el de AMP, esta enzima es capaz de apagar vías que consumen ATP y encender otras que ayuden a conservarlo (1).

*Recibido: 13 de marzo de 2008 Aceptado: 10 junio de 2008 (artículo publicado extemporáneamente)

¹Posgrado en Ciencias Bioquímicas ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., Delegación Coyoacán, CP 04510 Teléfono 56225280, Correo E: seleneffi@yahoo.com.mx