



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA SUBUNIDAD AKIN γ
DEL COMPLEJO HETEROTRIMÉRICO SNRK1 EN
*ARABIDOPSIS THALIANA***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

PRESENTA

SAMANTHA A. GAYTÁN MONDRAGÓN



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Coello por su asesoría durante la realización de este trabajo, así como por el apoyo recibido para complementar el trabajo experimental.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por toda la atención e invaluable ayuda en el desarrollo de esta tesis.

Al *teacher* Carlos, Fátima, Carmina y Ángel, del laboratorio 102.

Al Dr. León Martínez Castilla, por la asesoría, recomendaciones e ideas vertidas.

A la M. en C. Laura Espíndola Serna, la M. en C. Carmen Parra y el Dr. Martín Vargas por su asesoría técnica y Rosario Villegas Puente.

A mis amigos Jorge A. Campos González Angulo, Diego Martínez Villalobos y Beatriz Camacho Cruz (alias Tamma “La Niña Gato”), por su colaboración en distintos aspectos de esta tesis.

A David Apodaca Mendieta, por la paciencia, el café y por permitirme conocer un amor que existe en este mundo material y no en el éter, pero no por eso deja de ser hermoso.

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

Dedicatorias

Por el inigualable apoyo y confianza de siempre me mostraron juntos:

Padre, por enseñarme a vivir con alegría y no temer a la tristeza, porque de ti aprendí el placer de una vida sencilla y honorable.

Madre, por la entereza que has mostrado en cada aspecto de tu vida y por el valor para seguir con tu destino.

A María, mi tío Paco y mis tías, por todo lo que ha significado crecer entre ellos y compartir sus vidas.

A mi hermano, por impedirme envejecer deshonrosamente.

A mis amigos los clásicos, los románticos y los modernos.

A mi Dolly, por todos los días de plata y oro que pasamos juntas y por todos los recuerdos que en mi mente serán siempre verdes.

[Cormamin niuve tenna' ta elea lle au' ... Quel esta mellonamin!]

*Can dead be sleep, when life is but a dream?
And scenes of bliss pass as a phantom by?
The transient pleasures as a vision seem,
and yet we think that the greatest pain's to die.*

*How strange it is that man on earth should roam,
and lead a life of woe, but not forsake
His rugged path; nor dare he view alone
His future doom which is but to awake.*

John Keats

Índice general

Introducción

Nutrientes esenciales en plantas y biodisponibilidad del fósforo en suelos

Respuestas a nivel bioquímico, morfológico y molecular a la deficiencia de fósforo

Morfología de la raíz

Secreción de componentes químicos a la rizósfera

Respuesta a nivel bioquímico

Reutilización del fósforo en biomoléculas

Regulación génica frente a la deficiencia de fósforo

Familias de cinasas en eucariontes

Cinasas del tipo AMPK/ SNF1/ SnRK1

Estructura de los complejos SNF1/AMPK/SnRK1

Subunidad catalítica α

Subunidad reguladora β

Subunidad reguladora γ

Subunidades atípicas $\beta\gamma$

Regulación metabólica de las cinasas AMPK/SNF1/SnRK1

Función del complejo SnRK1 en deficiencia de fósforo

Arabidopsis thaliana como modelo de trabajo

Fluorescencia

Antecedentes

Hipótesis

Justificación

Objetivo general

Materiales

Electroforesis en agarosa para ácidos nucleicos

Electroforesis SDS-PAGE

Tinción de geles de poliacrilamida

Tinción de membranas con disolución de Rojo de Ponceau

Medio LB y antibióticos

Material biológico

Metodología

Clonación de AKIN γ en el vector de expresión pEt101-D

Ensayos preliminares de inducción de la expresión y purificación de AKIN γ

Inducción de la sobreexpresión de AKIN γ (2L)

Purificación de AKIN γ con Ni-NTA mediante FPLC

Purificación de AKIN γ con Ni-NTA (procedimiento alternativo)

Eliminación de Imidazol

Almacenamiento de AKIN γ

Determinación de la unión de AMP por ensayos de fluorimetría

Inmunodetección de AKIN γ en tejidos de *Arabidopsis thaliana*

Resultados y Discusión

Microarreglos e Inmunodetección de AKIN γ en tejidos de *Arabidopsis thaliana*

Western blot

Inmunolocalización en cortes de tejido de *A. thaliana*

Sobreexpresión de AKIN γ en *Escherichia coli*

Inducción de la expresión de AKIN γ con IPTG

Purificación de AKIN γ con Ni-NTA

Fluorimetría: Ensayos de titulación de AKIN γ con AMP

Apéndice I: Modelado estructural y dinámica molecular MD de AKIN γ

Apéndice II: Filogenia molecular de AKIN β , AKIN γ y AKIN $\beta\gamma$

Conclusiones

Referencias

Referencias adicionales

Índice de figuras

Fig. 1. Estructura del hexafosfato de inositol o ácido fítico.

Fig. 2. Disponibilidad de fósforo en suelos.

Fig. 3. Alteraciones en la morfología de *Arabidopsis thaliana*.

Fig. 4. Estructura de dominios de proteínas de la superfamilia de las CDPK-SnRK1.

Fig. 5. Estructura de las subunidad catalítica α de la familia de proteínas SNF1/AMPK/SnRK1.

Fig. 6. Estructura de las subunidades reguladoras β de la familia de proteínas SNF1/AMPK/SnRK1.

Fig. 7. Cartoon de la estructura de un motivo CBS.

Fig. 8. Representación esquemática de la subunidad AMPK γ de mamíferos.

Fig. 9. Estructura de la subunidad reguladora γ de la familia de proteínas SNF1/AMPK/SnRK1.

Fig. 10. Estructura de la subunidad reguladora atípica AKIN $\beta\gamma$.

Fig. 11. Representación del heterotrímero AMPK (AMP Activated Protein Kinase).

Fig. 12. Representación del heterotrímero SNF1 (Sucrose Non Fermenting).

Fig. 13. Representación del heterotrímero SnRK1 (Sucrose Non Related Kinase).

Fig. 14. Funciones del complejo SnRK1.

Fig. 15. Fotografía de las flores de *Arabidopsis thaliana*.

Fig. 16. Estructuras de fluoróforos típicos.

Fig. 17. Estructura de aminoácidos aromáticos.

Fig. 18. Plásmido pET101/D-TOPO.

Fig. 19. Análisis por microarreglos.

Fig. 20. Western blot de los tejidos aéreos de *A. thaliana*.

Fig. 21. Membrana de tejidos aéreos teñida con colorante rojo de Ponceau.

Fig. 22. Western blot y membrana de las raíces de *A. thaliana*.

Fig. 23. Microscopia confocal de un corte de hojas (Aumento 60X / Zoom 5x) y control PI.

Fig. 24. Microscopia confocal de un acercamiento sobre un corte de hojas.

Fig. 25. Imágenes generadas mediante microscopia confocal de un corte de flores y control.

Fig. 26. Microscopia confocal de un corte transversal de silicuas y control.

Fig. 27. Microscopía confocal de un corte transversal de raíz.

Fig. 28. Digestión doble con las enzimas de restricción XbaI y HindIII.

Fig. 29. Gel de electroforesis en agarosa con bromuro de etidio de los productos de PCR.

Fig. 30. Membrana teñida con rojo de Ponceau, relativa a la inducción de la sobreexpresión de AKIN γ .

Fig. 31. Western blot relativo a la inducción de la sobreexpresión de AKIN γ con IPTG.

Fig. 32. Purificación de AKIN γ con Ni-NTA en *lote*.

Fig. 33. Purificación de AKIN γ con Ni-NTA mediante FPLC.

Fig. 34. Purificación de AKIN γ con Ni-NTA mediante la técnica alternativa.

Fig. 35. Espectros de fluorimetría obtenidos al titular a la proteína AKIN γ con AMP.

Fig. 36. Espectro de IF intrínseca de AKIN γ .

Fig. 37. Espectro relativo a la adición de prácticamente 50 μ M de AMP.

Fig. 38. Espectro correspondiente a la adición de aproximadamente 150 μ M de AMP.

Fig. 39. Gráfico de la IF Vs [AMP] (μ M).

Fig.40. Tabla mdp.

Fig.41. Estructuras tridimensionales del modelo inicial y el confórmero más estable tras MD.

Fig.42. Confórmero más estable en la caja de H₂O y acercamiento de la estructura 3D.

Fig.43. Gráfico de Energía total durante la simulación MD de AKIN γ .

Fig.44. Gráfico de la desviación cuadrática media RMSD del esqueleto de la proteína AKIN γ .

Fig.45. Gráfico de la fluctuación de la desviación cuadrática media RMSF de la proteína AKIN γ .

Fig.46. Gráfico del giro (Rg) de la proteína AKIN γ .

Fig. 47. Resultado de la búsqueda de secuencias en la base de datos RefSeq.

Fig.48. Alineamiento CLUSTAL.

Fig.49. Estructuras tridimensionales del modelo final de AKIN γ , AMPK γ_1 (2V8Q) y SNF4 (2NYE).

Fig.50. Alineamiento estructural generado por MultiSeq.

Fig.51. Alineamiento estructural generado por TOPOFIT.

Fig.52. Estructura de dominios de las secuencias pertenecientes a AKIN γ , AKIN β y AKIN $\beta\gamma$.

Fig.53. Árbol filogenético NJ de las subunidades β y el dominio GBD/SBD de $\beta\gamma$.

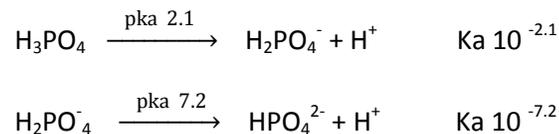
Fig.54. Árbol filogenético NJ de las subunidades γ y los dominios Bateman de $\beta\gamma$.

Introducción

Nutrientes esenciales en plantas y biodisponibilidad del fósforo en suelos

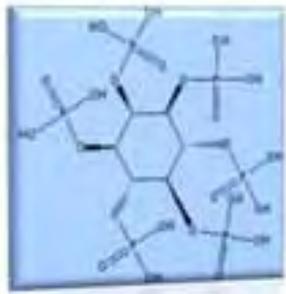
Las plantas son organismos autótrofos que requieren de gran variedad de sustancias, denominadas macro y micronutrientes, de acuerdo a su concentración relativa en tejidos. El fósforo es un macronutriente esencial para las plantas, debido principalmente a que es un componente estructural de ácidos nucleicos y fosfolípidos, además actúa como regulador en los mecanismos de fosforilación y desfosforilación de enzimas involucradas en rutas de transducción de señales [4].

El fósforo es absorbido por la planta en forma de los aniones derivados H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , mediante proteínas transportadoras especializadas, localizadas en las membranas de las raíces. En general, la adquisición de fósforo inorgánico depende de las características de acidez o basicidad del suelo, siendo favorecida cuando el pH del medio se encuentra en un rango de 5.0 - 6.0. Dados los valores de las constantes de disociación del fosfato diácido y monoácido, se establece que la especie predominantemente absorbida es el anión divalente HPO_4^{2-} [1]; [5].



Debido a las altas concentraciones de fósforo requeridas en el citoplasma de las células (5-10 mM) comparada con la existente en el suelo (1-10 μM), se establece que dicho elemento es transportado de forma activa, con consumo de energía por parte de la planta. La adquisición de fósforo está acoplada al simporte de protones (2H^+ ó $4\text{H}^+ / \text{H}_2\text{PO}_4^-$) hacia el interior del citoplasma, con gasto de ATP.

Dada su alta reactividad, el fósforo se combina fácilmente con otros elementos, presentando especial afinidad por el O_2 molecular para dar paso a sustancias como el ortofosfato PO_4^{3-} , un componente de aproximadamente 170 formas minerales con alto contenido de Ca, entre los que destacan la apatita $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F,Cl,OH})$ y algunos ferroaluminatos, no aprovechables por



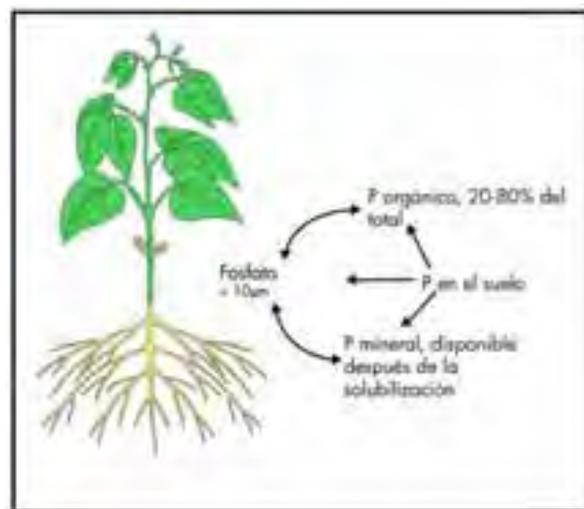
organismos vegetales [6]. No obstante, entre el 20 % y 80 % del fósforo en suelos se encuentra combinado con compuestos orgánicos como el inositol, dando paso a compuestos como el presentado en la Fig.1.

Fig. 1. Estructura del hexafosfato de inositol o ácido fítico.

La disponibilidad de fósforo en suelos está regulada por procesos geoquímicos y biológicos. En la mayoría de los ecosistemas naturales, los procesos geoquímicos determinan su distribución en el suelo y subsuelo, aunque son los procesos biológicos los que condicionan directamente su disponibilidad en la porción del suelo inmediata a las raíces. Al tratarse de procesos intrínsecos al intercambio dinámico de materia y energía dentro de un ecosistema, las interacciones con microorganismos, tales como *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Aspergillus* resultan importantes. Estos organismos establecen relaciones simbióticas con plantas, particularmente en condiciones de privación de fósforo, favoreciendo la mineralización de las formas orgánicas de dicho elemento en el suelo al producir fitasas, encargadas de hidrolizar el inositol hexafosfato o ácido fítico.

Por otro lado, diversos fenómenos climáticos y geológicos limitan la biodisponibilidad del fósforo, de modo que su concentración en el suelo decrece de manera importante en la rizósfera y en la interfase suelo-raíz (Fig.2). La deficiencia de fósforo, por tanto, se considera uno de los problemas que limitan la producción de cosechas en países de climas tropicales y subtropicales [7].

Fig. 2. Disponibilidad de fósforo en suelos. La principal forma de asimilación de fósforo por la planta es en forma de P inorgánico y otras formas biodisponibles en concentraciones menores a 10 μ M. Adaptado de [1].



Respuestas a nivel bioquímico, morfológico y molecular a la deficiencia de fósforo

Los mecanismos de respuesta ante la deficiencia de fósforo son estrategias adaptativas de los organismos que permiten aumentar la eficiencia en la adquisición del nutriente poco disponible en el suelo, al tiempo en que potencian su aprovechamiento, para optimizar la cantidad de biomasa por unidad de nutriente tomado [8].

Entre los cambios desarrollados para favorecer la adquisición del nutriente se encuentra la alteración de la arquitectura de la raíz, así como la secreción de componentes químicos hacia la rizósfera [9].

Morfología de la raíz

Las plantas que crecen en suelos pobres en fósforo alteran la arquitectura de su raíz, al detener el crecimiento de la raíz primaria y aumentar el número y longitud de raíces secundarias. Las modificaciones permiten a la planta el acceso a una mayor superficie de suelo para la obtención de nutrientes, siendo los pelos radiculares los que contribuyen significativamente al incremento del área de la raíz al constituir el sitio primario de adquisición de fósforo en *Arabidopsis thaliana*, que no forma asociaciones con microorganismos [10].



Fig. 3. Alteraciones en la morfología de *Arabidopsis thaliana*. Durante la deficiencia de fósforo se hace patente la disminución del tamaño de la roseta en plantas estresadas (derecha), con respecto a plantas desarrolladas en condiciones de suficiencia (izquierda), así mismo, es posible observar una coloración más intensa en las hojas.

Secreción de componentes químicos a la rizósfera

La exudación de ácidos orgánicos, fosfatasas ácidas y nucleasas para solubilizar o liberar fósforo inorgánico de fuentes en el suelo, es una de las estrategias que más utiliza la planta para adaptarse a las condiciones de privación de fósforo. La exudación de aniones de ácidos orgánicos acidifica el suelo, liberando el fosfato de algunos complejos de fósforo, al tiempo que sirve como fuente de carbono a microorganismos capaces de incrementar la disponibilidad de dicho elemento al secretar enzimas como fosfatasas y fitasas. Se sabe también, que los microorganismos asociados a las raíces permiten cambiar el pH del suelo hacia valores menores, al secretar ácidos carboxílicos como el ácido cítrico, acético, málico, fumárico, succínico, láctico, además de los carboxilatos oxalacetato y malonato [11].

Respuesta a nivel bioquímico

Bajo condiciones de deficiencia de fósforo en suelos, los niveles de dicho elemento en el citoplasma disminuyen. Cuando el estrés nutrimental es severo, la concentración de ATP decrece hasta en un 80 %, afectando diversas rutas del metabolismo de la planta incluyendo la fotosíntesis, fijación de carbono, glucólisis y respiración celular [12].

Para reducir el impacto, las plantas han modificado algunas rutas metabólicas que les permiten continuar con la producción de energía y procesos relacionados con el metabolismo de carbono, aún en condiciones de deficiencia energética.

Quizás uno de los mejores ejemplos lo constituye el aumento en la utilización de pirofosfato (producido durante la síntesis de macromoléculas esenciales), para soportar un crecimiento disminuido, y acumulado en el citoplasma de las células vegetales en concentraciones de aproximadamente 0.5 mM, dada su baja reactividad frente a la hidrólisis. Las plantas tienen enzimas que utilizan dicho compuesto para incrementar la eficiencia energética de diversos procesos celulares. A nivel de glucólisis, por ejemplo, existen enzimas que catalizan reacciones alternativas de esta ruta utilizando pirofosfato independientemente de la concentración de adenilatos o fosfato, lo que permite mantener el flujo catabólico requerido para la obtención de energía y piruvato durante estrés severo. Estas enzimas son:

- **Sacarosa sintasa** dependiente de pirofosfato, convierte la sacarosa a hexosas fosfato como vía alterna a la ruta de la invertasa dependiente de ATP.
- **Fosfofructotransferasa** dependiente de pirofosfato, cataliza la conversión reversible de fructuosa-6-fosfato en fructuosa-1,6-difosfato al tiempo en que se inhibe la actividad de ATP-fosfofructocinasa.
- **NADP-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante**, sustituye a la NAD-gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa fosforilante.

Otra modificación metabólica observada durante la deficiencia de fósforo consiste en la sobreexpresión de enzimas que favorecen la liberación y reutilización de fosfatos. Las enzimas de localización citoplasmática UDP-glucosa pirofosforilasa, sacarosa fosfato sintasa y fructuosa-1,6-difosfatasa, resultan claves en la síntesis de sacarosa, dando como subproducto de la reacción fósforo inorgánico.

En *Arabidopsis thaliana*, se presenta un incremento en la cantidad de almidón en tejidos fotosintéticos durante periodos de estrés, esta respuesta es mediada por el aumento en la expresión de genes de enzimas biosintéticas implicadas en esta vía, tal como la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), así como por la reducción en la movilización del almidón durante periodos de oscuridad [13], [14]. Así mismo, se presenta una reducción en el intercambio de triosas fosfato por fósforo inorgánico a través de las membranas del cloroplasto, de tal forma que la conversión de azúcares fosfato a almidón se ve favorecida, al igual que la liberación consecuente de fósforo inorgánico dentro del cloroplasto, para su utilización durante la fotosíntesis [15].

Reutilización de fósforo en biomoléculas

La reutilización del fosfato almacenado es otra de las alternativas usadas por las plantas para mantener su homeostasis. Para asegurar su supervivencia, las plantas movilizan el fósforo que se encuentra combinado con diferentes biomoléculas. Durante la privación de fosfato inorgánico, los fosfolípidos son sustituidos en las membranas de los tilacoides por sulfolípidos y galactolípidos [16]; la acumulación de glucolípidos también se presenta en las membranas de mitocondrias y cloroplastos [17]. Finalmente, otro mecanismo que desarrolla la planta es el reciclaje de fósforo inorgánico, al movilizarlo desde tejidos senescentes mediante su transporte por el floema a tejidos en crecimiento.

Regulación génica frente a la deficiencia de fósforo

Las modificaciones metabólicas mencionadas anteriormente dependen de cambios en la expresión génica; es decir, la deficiencia de fósforo es capaz de estimular el aumento o disminución de la expresión de genes específicos, permitiendo a la planta adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Los genes regulados ante la deficiencia de fósforo codifican a enzimas que participan en rutas metabólicas involucradas en la biogénesis y división celular, así como en el metabolismo de ácidos nucleicos, aminoácidos, síntesis de proteínas, senescencia y transducción de señales [18]. Algunos de los genes identificados en la respuesta específica al estrés nutrimental por escasez de fósforo incluyen a aquellos que codifican a fosfatasas ácidas, RNAsas, fosfodiesterasas y proteínas transportadoras de fósforo [5].

En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado once posibles factores de transcripción que actúan en deficiencia de fosfato inorgánico, entre los que destacan Pho2 y Pho4. Estudios de la expresión global de genes indican que la respuesta a la deficiencia en este caso, es diferente en cada uno de los tejidos de la planta: genes como los transportadores de alta afinidad aumentan sus niveles de transcrito en las raíces de las plantas, en tanto que su expresión se ve disminuida en la roseta. Sin embargo, a pesar de los avances en la comprensión de la respuesta a la deficiencia de fósforo, poco se conoce acerca de los componentes moleculares de las rutas de transducción de señales que regulan dichos procesos [19].

Nuestro grupo de trabajo ha identificado genes que codifican proteínas probablemente implicadas en vías de transducción de señales durante estrés por privación de fósforo. El regulador de respuesta tipo A denominado PvRR1 se aisló de una biblioteca de cDNA de plantas de *Phaseolus vulgaris*, desarrolladas bajo estrés nutrimental. PvRR1 participa en la transducción de señales promovidas por citocinas y presenta una localización nuclear. Así mismo, incrementa sus niveles de transcrito primario, siendo capaz de retornar a su nivel basal al suplementar fosfato inorgánico al medio [20]. Por otro lado, se identificó un gen que presenta alto grado de similitud con la subunidad catalítica del complejo con actividad de cinasa AMPK (AMP-activated protein kinase) de animales y el SNF1 (Sucrose Non Fermenting) de levaduras. En plantas las proteínas ortólogas de esta familia de cinasas se han denominado SnRK1 (SNF1 Related Kinase).

Familias de cinasas en eucariontes

Las enzimas pertenecientes a la superfamilia de proteínas cinasas en eucariontes catalizan la transferencia irreversible de γ -fosfato a partir de ATP a aminoácidos localizados en las cadenas laterales de diversas proteínas. Se sabe que el grado de fosforilación de una proteína puede tener profundos efectos sobre su actividad como enzima y en su interacción con otras proteínas. Cerca de 3 % del genoma funcional de los eucariontes codifica cinasas, lo que sugiere su relevancia en múltiples rutas metabólicas [21].

Las cinasas en eucariontes se subdividen en aquellas que fosforilan residuos de Ser/Thr y aquellas que fosforilan Tyr, aunque se ha encontrado evidencia de la existencia en eucariontes de proteínas relacionadas con la familia de cinasas que fosforilan His en procariontes. Las enzimas de esta superfamilia se relacionan evolutivamente debido a que presentan homología en dos dominios catalíticos de una longitud de 250 a 300 aminoácidos con regiones alternadas de alta y baja conservación. Así mismo, existen 12 regiones referidas como subdominios, algunos de los cuales contienen residuos idénticos o similares en lo que a propiedades fisicoquímicas se refiere [22].

Un estudio realizado sobre el genoma completo de *Arabidopsis thaliana* permitió identificar las cinasas pertenecientes a la superfamilia CDPK-SnRK, examinándose además sus orígenes evolutivos. Se sabe que *Arabidopsis* contiene 38 cinasas relacionadas a la SNF1 de levadura, divididas en tres subgrupos de acuerdo al grado de similitud encontrada en su secuencia primaria y la estructura de dominios (Fig.4). Entre estos, el grupo conformado por las SnRK1 es el más cercano en términos evolutivos tanto a las SNF1 de levadura como a las AMPK de animales. Cabe destacar que únicamente 3 secuencias en *Arabidopsis* pertenecen al grupo de las SnRK1, las proteínas más grandes de la superfamilia SnRK al poseer una masa molecular promedio entre 56.7 y 57.8 kDa [23].

Las SnRK1, al igual que sus ortólogas, conforman la familia SNF1/AMPK/SnRK1, enzimas altamente conservadas en todos los eucariontes cuya función elemental consiste en mantener el balance energético y actuar como transductores en las cascadas de señalización en respuesta a estímulos específicos [2, 24].

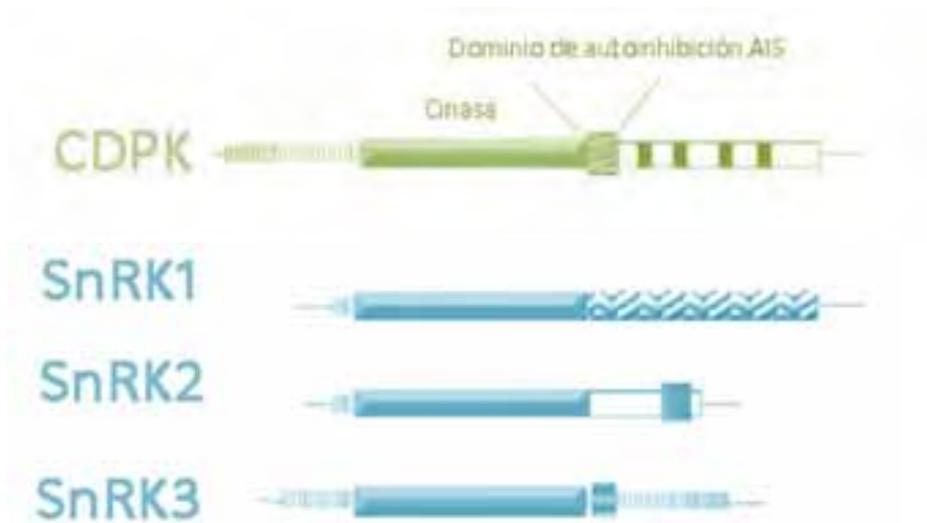


Fig. 4. Diagramas que representan la estructura de dominios de algunas cinasas de proteína pertenecientes a la superfamilia de las CDPK-SnRK. Las líneas discontinuas en el extremo N-terminal indican la presencia de regiones de longitud y función variable. Las regiones hacia el C-terminal en la familia de las SnRK1 ilustran el dominio de autorregulación, los bloques que se observan en el caso de SnRK2 y SnRK3 representan dominios de autoinhibición.

Por otra parte, los subgrupos SnRK2 y SnRK3 parecen ser exclusivos de plantas. En *Arabidopsis thaliana*, 10 genes codifican proteínas SnRK2, que carecen de aproximadamente 140-160 aminoácidos con respecto a las SnRK1, con una masa molecular promedio de 40 kDa; además, presentan una zona característica de residuos ácidos en el extremo carboxilo terminal. Finalmente, 25 de las SnRKs pertenecen al subgrupo de las SnRK3, representado por las cinasas anteriormente conocidas como CBL-interacting protein kinases (CIPKs) y cinasas S (PKS) que interactúan con proteínas activadas por Ca (II) como las SOS3 y CBLs, relacionadas con los sensores neuronales en animales y la subunidad reguladora β de la fosfatasa calcineurina, involucrada en la respuesta fisiológica al estrés salino y a la señalización por diversos azúcares y ácido abscísico ABA [21].

La característica distintiva de la familia de las SnRKs con respecto a otras proteínas cinasas, consiste en la presencia de un residuo de Thr en el asa de activación, mientras que la mayoría de las CDPKs poseen residuos de Asp ó Glu en esta posición. Por otro lado, prácticamente ninguna de las SnRKs de los subgrupos 1, 2 ó 3 presenta una secuencia N-terminal que putativamente consiste en un sitio miristoilado (modificación postraduccional que consiste en la formación de un enlace

covalente entre un grupo miristoilo y el extremo amino terminal) lo que abre la posibilidad de que estas proteínas se encuentren asociadas transitoriamente a membranas [25].

Cinasas del tipo AMPK/ SNF1/ SnRK1

Las proteínas ortólogas AMPK/SNF1/SnRK1 son una familia de cinasas altamente conservadas en eucariontes, involucradas en mecanismos de control del balance energético al interior de las células. Se consideran elementos de gran relevancia dado su papel como transductores en las cascadas de señalización que permiten la adaptación de los organismos a condiciones ambientales cambiantes [3].

Las cinasas AMPK son reguladores centrales de la homeostasis energética, capaces de coordinar diversas rutas metabólicas para mantener un balance adecuado entre la adquisición de nutrientes y la demanda energética. La activación del complejo AMPK protege a la célula del estrés patológico y fisiológico que disminuye la relación de AMP/ATP, incluyendo condiciones de deficiencia nutricional, hipoxia, isquemia y ejercicio. Una vez activada, AMPK actúa para conservar la energía al redirigir el metabolismo hacia la producción de ATP, al tiempo que inhibe rutas anabólicas mediante la fosforilación de enzimas clave involucradas en la síntesis de ácidos grasos, colesterol, síntesis de proteínas y metabolismo central de carbohidratos. Así mismo, las AMPK regulan la homeostasis corporal total, al controlar la ingesta de alimentos y el peso corporal en respuesta a leptina, adiponectina y grelina; por tanto, el complejo es considerado actualmente como uno de los blancos más importantes para el tratamiento de diabetes tipo II y obesidad [26].

En levaduras, SNF1 regula el cambio diauxotrófico del metabolismo fermentativo al oxidativo en respuesta a la deficiencia de glucosa, al utilizar el EtOH producido como fuente de carbono alternativa [27]. Se ha comprobado que las mutantes en SNF1 resultan incapaces de sobrevivir en medios cuya fuente de carbono sea distinta de glucosa, dado que los genes involucrados en la respuesta metabólica a la deficiencia de glucosa no son encendidos por acción de la cinasa. Al fosforilar e inactivar al represor transcripcional Mig1, SNF1 promueve su translocación al citoplasma liberando los genes reprimidos que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de fuentes alternas de carbono. Se sabe que aproximadamente 400 genes de *Saccharomyces cerevisiae* son dependientes de la acción de SNF1, ya que codifican proteínas

relevantes en la transcripción, por ejemplo, al regular la unión de la TBP (TATA Binding Protein) a sus promotores, afectando indirectamente al complejo RNA polimerasa II [2].

En plantas, se ha sugerido que el complejo SnRK1 está involucrado en la regulación del metabolismo de carbohidratos y la respuesta a condiciones de estrés nutricional, al igual que sus homólogos [28]. En estudios iniciales *in vitro*, se observó que el complejo SnRK1 era capaz de fosforilar residuos de Ser e inactivar a cuatro importantes enzimas: i) 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa (HMGCoA) que participa en la síntesis de hormonas isoprenoides, ii) sacarosa fosfato sintasa (SPS) implicada en la síntesis de sacarosa, iii) nitrato reductasa (NR) encargada de catalizar el primer paso de la asimilación de N en la síntesis de aminoácidos y iv) trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS6), enzima clave en la regulación de la síntesis de almidón [29].

Además, SnRK1 indirectamente controla el metabolismo de carbohidratos al modular la transcripción de genes que codifican a proteínas como la sacarosa sintasa y α -amilasa. Por otro lado, el complejo SnRK1 estimula la activación redox de la ADP glucosa fosforilasa AGPasa, un regulador de la biosíntesis de almidón en respuesta a los niveles de sacarosa [30].

SnRK1 también está implicada en la respuesta metabólica a condiciones de estrés salino [31], así como en estrategias de supervivencia y defensa a herbívoros, en los cuales la proteína SnRK1 favorece la relocalización de azúcares hacia la raíz [32].

Finalmente, este complejo se encarga de regular la inducción y represión de genes involucrados en diversos procesos. La identificación de sustratos peptídicos para la SnRK1 ha proporcionado un método altamente conveniente para evaluar su actividad como cinasa; los primeros ensayos se realizaron sobre el péptido SAMS, construido con base en la secuencia del sitio de la acetil CoA carboxilasa susceptible de ser fosforilado por la AMPK de rata, de donde adquiere su nombre (Ser Ala Met Ser).

Los ensayos con dichos péptidos han permitido hacer inferencias importantes acerca de las características estructurales de la enzima, tal como el motivo de reconocimiento en el que se incluye el residuo de Ser por medio del cual se lleva a cabo la fosforilación sobre HMGCoA, o secuencias de aminoácidos que favorecen la actividad de la misma.

Estructura de los complejos SNF1/AMPK/SnRK1

Las cinasas AMPK/SNF1/SnRK1 se componen estructuralmente de una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras β y γ , dando lugar a un complejo heterotrimérico. En mamíferos se conocen múltiples isoformas para cada subunidad, permitiendo la formación de aproximadamente 12 combinaciones heterotriméricas distintas, que se piensa, constituyen en un mecanismo elegante de señalización y regulación de las funciones del complejo al condicionar la localización subcelular de estas proteínas [23]. De igual forma, en *Arabidopsis thaliana* cada subunidad está codificada por múltiples genes dando lugar a gran variedad de posibles complejos [2]. Los primeros datos estructurales se obtuvieron a partir del complejo de levadura.

Subunidad catalítica α

La subunidad α de la familia de cinasas AMPK/SNF1/SnRK1 presenta un dominio catalítico Ser/Thr estructuralmente caracterizado por poseer un asa de activación localizado hacia el extremo N-terminal en el cual la fosforilación se efectúa por cinasas río arriba sobre un residuo de Thr, siendo la T²¹⁰ en SNF1, T¹⁷² en AMPK y T¹⁷⁵ en AKIN10 y AKIN11 de *Arabidopsis thaliana*. El dominio de activación denominado KCD (Kinase Catalytic Domain) induce la activación de la enzima [33-34]. Además, tal como se aprecia en la Fig. 5, la subunidad α exhibe una secuencia de autoinhibición AIS (Autoinhibitory Sequence) relacionada con los dominios de asociación a ubiquitina UBA (Ubiquitin Associated Domain) y encargada de suprimir la actividad de cinasa; el dominio AIS se encuentra en una posición adyacente al dominio KCD y es seguido por una región de alta flexibilidad. Hacia el extremo C-terminal, existe una región bien conservada, requerida para la formación del complejo heterotrimérico, al mediar la interacción con las subunidades β y γ [35].

En levaduras, la subunidad catalítica α , se denomina SNF1 debido a que es codificada únicamente por el gen *Snf1*. En animales en cambio, las dos isoformas conocidas son codificadas por $\alpha 1/PRKAA1$ y $\alpha 2/PRKAA2$ [24]. En *Arabidopsis thaliana*, se conocen tres genes que codifican a las subunidades catalíticas AKIN10, AKIN11 y AKIN12, de los cuales únicamente *akin10* y *akin11* son transcritos [36].

Se sabe que las proteínas de la familia AMPK/SNF1/SnRK1 presentan una identidad del 48 % en toda su secuencia, sin embargo alcanzan entre el 60-65 % en lo que al dominio de cinasa (localizado en la subunidad catalítica α) se refiere. La conservación de esta familia durante la evolución se extiende, inclusive, a las subunidades no catalíticas β y γ .



Fig. 5. Estructura de la subunidad catalítica α de la familia de proteínas SNF1/AMPK/SnRK1. La subunidad presenta un dominio característico de cinasas Ser/Thr, un dominio de autoinhibición (AIS) y un dominio de interacción con las subunidades reguladoras. El P indica que la subunidad es susceptible de ser fosforilada por una cinasa río arriba.

Subunidad reguladora β

En mamíferos se conocen dos isoformas de la subunidad β , codificadas por los genes *PRKAB1* y *PRKAB2*, sin embargo, en el caso de levaduras existen tres diferentes genes que codifican a esta subunidad reguladora, denominados *SIP1* y *SIP2* (Snf1-interacting protein 1 y 2) y *GAL83* (Galactose metabolism 83). La subunidad β favorece la formación del heterotrímero debido a su capacidad de interactuar de manera independiente con las subunidades α y γ . Como se muestra en la Fig. 6, hacia el extremo C-terminal, la subunidad presenta dos dominios bien conservados denominados ASC (Association with SNF1 Complex), capaces de mediar la interacción con la subunidad reguladora γ , además del dominio KIS (Kinase Interacting Sequence) mencionado anteriormente y encargado de favorecer la interacción con la subunidad catalítica [28]. En mamíferos, existe evidencia de que únicamente el dominio ASC participa en la formación del heterotrímero, a diferencia de las levaduras [37]. Aunado a lo anterior, las subunidades β también presentan un dominio de unión a carbohidratos localizado a la mitad de la secuencia de la proteína y que traslapa con el dominio KIS; permite la asociación de glucógeno (en mamíferos) o almidón (en plantas) al complejo $\alpha\beta\gamma$. Este dominio, denominado GBD (Glycogen Binding Domain),

se relaciona además con secuencias presentes en proteínas como la N-isoamilasa y enzimas relacionadas con la ramificación de glucógeno y en el reconocimiento de enlaces alfa 1-6 y 1-4 en carbohidratos complejos como la ciclodextrina (Fig.6).

En plantas, las subunidades β se agrupan en aquellas que presentan los dominios GBD, KIS y ASC; en *Arabidopsis thaliana* se conocen las subunidades reguladoras AKIN β_1 y AKIN β_2 que cumplen con las características enunciadas, sin embargo, la subunidad AKIN β_3 no exhibe el dominio característico GBD, ni la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal, por lo que bien se puede tratar de una forma truncada de las subunidades β típicas, que no ha perdido la capacidad de unirse con las subunidades restantes para dar paso al heterotrímero [38].



Fig. 6. Estructura de las subunidades reguladoras β de la familia de proteínas SNF1/AMPK/SnRK1. La subunidad posee un dominio de unión a glucógeno o almidón GBD/SBD, el dominio KIS de interacción con la subunidad α y en el caso de levaduras y plantas un tercer dominio ACS de asociación con las otras subunidades.

Tal como se mencionó previamente, las subunidades β funcionan como sistemas de anclaje para las subunidades α y γ , al tiempo en que determinan la localización subcelular de la proteína y modulan la actividad del heterotrímero, así por ejemplo, se ha demostrado que las diferentes isoformas de la subunidad reguladora en levaduras dirigen a SNF1 al núcleo, vacuola o citoplasma. Cabe destacar que el dominio GBD es extensivo a las subunidades β de eucariontes, aunque su relevancia metabólica no ha sido elucidada, si bien se ha determinado que interactúa con glucógeno.

La similitud entre secuencias de las subunidades β se limita a los tres dominios ASC, KIS y GBD previamente mencionados. En el extremo N-terminal las subunidades β presentan secuencias poco conservadas y de poca similitud; en levaduras se considera que dicha variabilidad determina la localización subcelular del complejo.

Subunidad reguladora γ

En mamíferos se conocen tres isoformas de la subunidad γ , codificadas por $\gamma_1/PRKAG1$, $\gamma_2/PRKAG2$ y $\gamma_3/PRKAG3$, homólogas a la subunidad reguladora SNF4, codificada por el gen *Snf4* en el genoma de levaduras. En el genoma de plantas, γ es codificada por *PV42* en *Phaseolus vulgaris*, *SnIP1* en *Hordeum vulgare* y *AKIN γ* con tres isoformas conocidas en *Arabidopsis thaliana*. Dentro del genoma de plantas también se codifica a la subunidad atípica *AKIN $\beta\gamma$* [39]; [40].

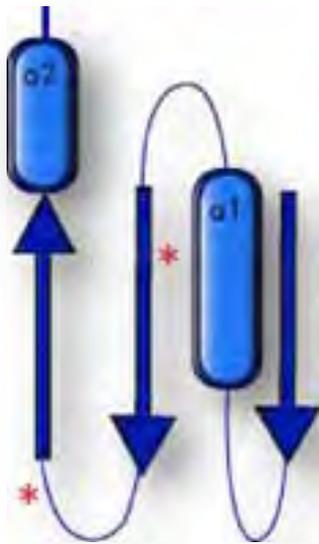
La familia de las proteínas *PV42/SnIP1* presenta aproximadamente un 25 % de identidad con respecto a las subunidades SNF4 de levaduras y *AMPK γ* de mamíferos, por lo que estas últimas son capaces de interactuar con el complejo SnRK1. Además, *PV42/SnIP1* poseen un motivo hidrofóbico de poca longitud denominado SnIP, similar a la secuencia de reconocimiento del sustrato para fosforilación del complejo de plantas, por lo que se sugiere que el motivo representa un pseudosustrato para la cinasa [28].

El grado de conservación de esta subunidad reguladora en eucariontes varía entre el 20 - 35 % de identidad, presentándose mayor similitud entre las mismas en lo que a cuatro motivos de una extensión de aproximadamente 60 residuos de aminoácidos, localizados hacia la región C-terminal se refiere [41].

Alexander Bateman identificó inicialmente dichas secuencias en tándem denominadas motivos CBS (a partir de cistación- β sintasa), al analizar el genoma de *Methanococcus jannaschii* en busca de duplicaciones internas. Las secuencias CBS se presentan en pares en gran diversidad de proteínas codificadas en organismos pertenecientes a Archaea y Eukarya, incluyendo la IMP deshidrogenasa (IMPDH), en cuya estructura cristalográfica se muestra el par de motivos CBS

(Fig.7) que en conjunto forman un dominio estructural discreto denominado dominio Bateman [42].

Anteriormente, se consideraba que los dominios Bateman funcionaban en pares para favorecer la formación de interacciones con nucleótidos de adenosina, como el AMP y ATP, dependiendo del estado energético a nivel celular. Sin embargo, de acuerdo a los datos publicados



recientemente por los grupos de trabajo de [43] y [26] sobre las estructuras cristalográficas de la proteína de *Saccharomyces pombe* en complejo con derivados sintéticos de nucleótidos y la subunidad γ_1 en complejo con AMP y ATP, se ha demostrado que en realidad existen cuatro sitios potenciales para la unión de nucleótidos en la subunidad de mamíferos, los cuales corresponden a los cuatro motivos CBS y no un equivalente por cada dominio Bateman, como se sostenía.

Fig. 7. Muestra la definición de los dominios CBS, compuestos por una hoja de tres cadenas β compuestas, empaquetadas con dos hélices.

Se tiene evidencia de que la subunidad reguladora SNF4 se encarga de estabilizar la conformación activa de los complejos heterotriméricos SNF1, por su unión al dominio AIS de la subunidad catalítica; por otro lado, se ha inferido que los sitios de regulación alostérica del complejo AMPK se localizan en la subunidad γ_1 , de acuerdo a los datos obtenidos sobre la dependencia del heterotrímico por AMP, variando su afinidad en relación a la isoforma de γ que conforma al complejo [23].

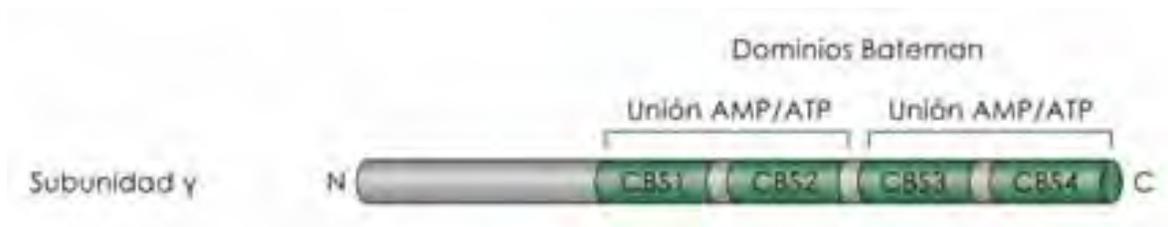


Fig. 8. Estructura de la subunidad reguladora γ , que presenta dos dominios Bateman, en los que cada motivo CBS es un sitio potencial de unión a nucleótidos de adenosina.

Kemp, Oakhill *et al.* (2007), proponen una nueva nomenclatura (Fig.8) para los sitios de unión de nucleótidos de acuerdo al motivo CBS en el cual el residuo de Asp que interactúa con los grupos hidroxilo 2' y 3' de la ribosa está presente.

- El sitio I corresponde al CBS₁ (antes 2), en donde el AMP se intercambia por ATP.
- El sitio II corresponde al CBS₂ (antes 4), no une AMP.
- El sitio III corresponde al CBS₃ (antes 1), en donde el AMP se intercambia por ATP.
- El sitio IV corresponde al CBS₄ (antes 3), AMP no intercambiable.

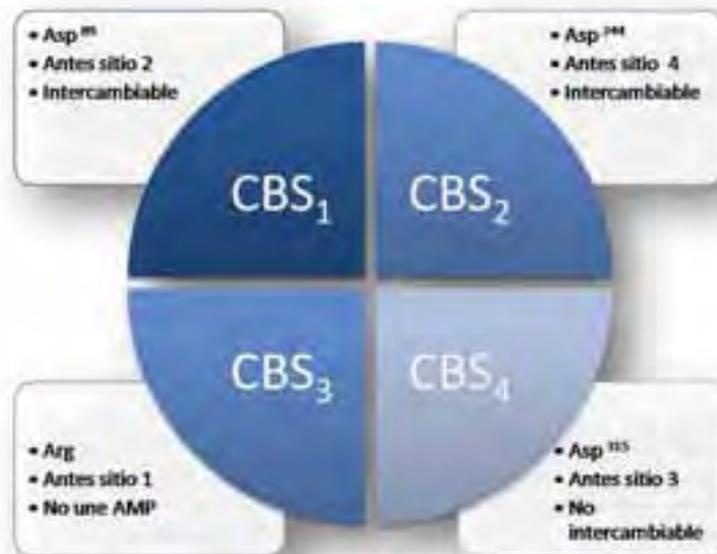


Fig. 9. Representación esquemática de la subunidad γ de mamíferos, en la cual los motivos CBS son designados de acuerdo a su nueva nomenclatura.

Además, en el extremo C-terminal la subunidad reguladora γ presenta regiones de baja conservación involucradas en la interacción con las subunidad β . Dicha región en la ortóloga de levaduras SNF4, está conformada estructuralmente por hélices alfa-beta y una hoja β que interactúa con asas β_2 y β_3 de la subunidad β . En mamíferos las subunidades γ_2 y γ_3 contienen extensiones en el extremo N-terminal no relacionadas, generadas mediante eventos de splicing alternativo del mRNA [44]. Diez mutaciones puntuales en la subunidad γ_2 humana están asociadas con el almacenamiento de glucógeno en cardiomiopatías y la preexcitación ventricular ó síndrome de Wolff- Parkinson-White [45].

Ocho de los residuos afectados se encuentran en regiones próximas a los sitios que intervienen en la interacción con nucleótidos y seis de ellos se encargan de la unión de los grupos fosfato [43]. Se sabe también, que la unión de AMP y la activación del complejo AMPK, así como la actividad basal se incrementan proporcionalmente con el grado de fosforilación del residuo de Thr¹⁷² [46]. Lo anterior, se debe presumiblemente a una reducción concomitante en la afinidad por ATP y a la disminución consecuente de la actividad de fosfatasas [47]. En cerdos, mutaciones en la subunidad γ_3 ocasionan padecimientos similares en músculo esquelético [48].

Subunidades atípicas $\beta\gamma$

En el 2001, en el genoma de *Zea mays* se identificó una subunidad perteneciente a la segunda familia de subunidades γ , denominada ZmAKIN $\beta\gamma$. Al igual que su ortóloga AtSNF4 o AKIN $\beta\gamma$ en *Arabidopsis thaliana*, se trata de proteínas quiméricas que presentan los dominios característicos de las subunidades reguladoras γ y β , de tal manera que son capaces de suplir a la subunidad SNF4 en levaduras y complementar el heterotrímero [49].

Hacia el extremo N-terminal, presentan el dominio GBD propio de la subunidad β , aparentemente fusionado con las secuencias en tándem, relacionadas con los motivos CBS de las subunidades γ dispuestos hacia el C-terminal, tal como se muestra en la Fig.10. Cabe destacar que el origen evolutivo de esta familia de proteínas se desconoce [50].

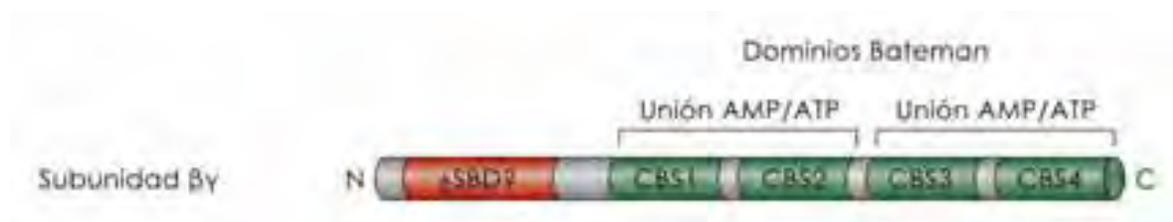


Fig. 10. Estructura de la subunidad reguladora atípica $\beta\gamma$, que presenta tanto los dominios Bateman característicos de la subunidad γ como un dominio de unión a almidón SBD, típico de las subunidades reguladoras β .

A continuación, se presentan esquemas que ejemplifican las similitudes y diferencias en los complejos heterotriméricos de cada reino. Las Fig. 11, 12 y 13, diseñadas a partir del artículo [2], ilustran cómo la importancia relativa de cada subunidad en la estabilidad termodinámica del complejo ha divergido entre reinos, mientras que la estabilidad total del heterotrímero no se ha visto comprometida. La fuerza de las interacciones entre las subunidades que conforman a los complejos se simboliza como líneas continuas y punteadas.

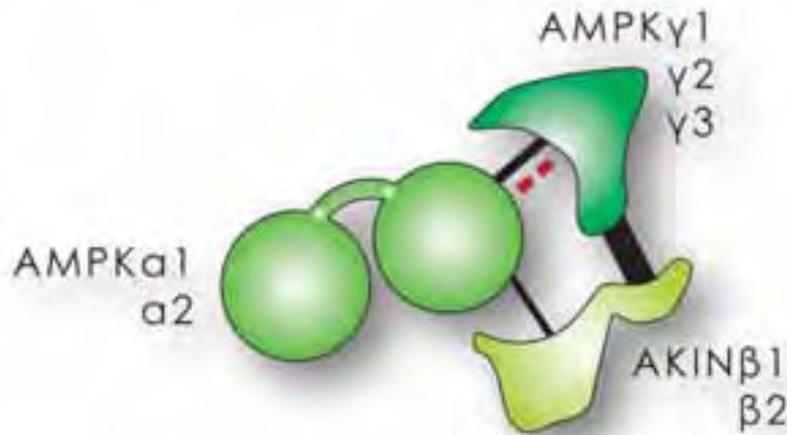


Fig. 11. Representación del heterotrímero AMPK (AMP Activated Protein Kinase) en animales. El complejo es estable únicamente al estar presentes las tres subunidades. Se requiere la presencia de AMP para la interacción entre α y γ [2].

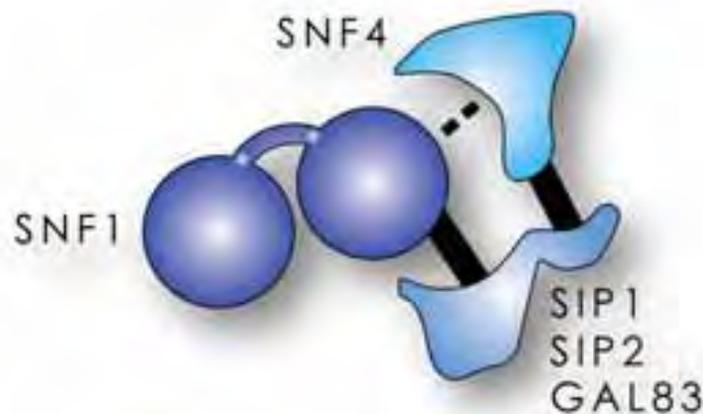


Fig. 12. Representación del heterotrímero SNF1 (Sucrose Non Fermenting) en levaduras. SNF4 interactúa con SNF1 en ausencia de glucosa; la estabilidad del complejo depende de las interacciones mediadas por el dominio KIS en la subunidad β .

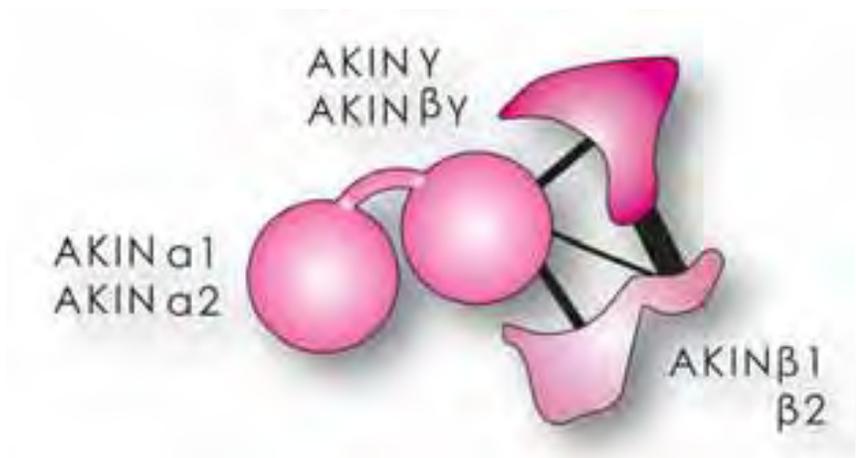
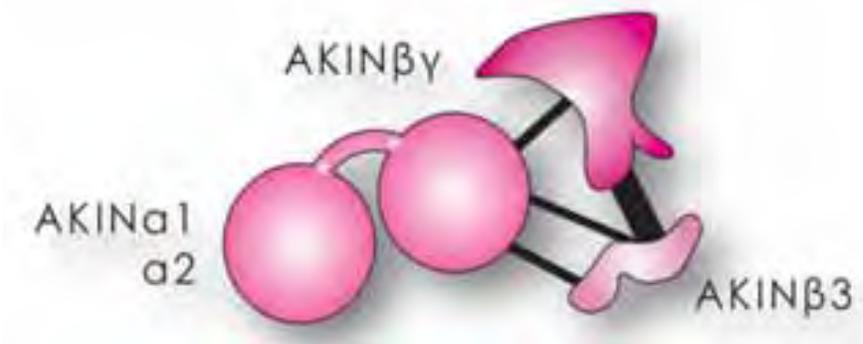


Fig. 13. Representación del heterotrímero SnRK1 (Sucrose non Related Kinase) en plantas. El complejo se estabiliza por la interacción entre el dominio ASC de la subunidad α y las subunidades reguladoras γ o $\beta\gamma$, así como por el tipo de subunidad β que participa en su formación.

Regulación metabólica de las cinasas AMPK/SNF1/SnRK1

La activación del complejo AMPK, así como la de sus ortólogos SNF1 y SnRK1, requiere de la presencia de las tres subunidades que conforman al heterotrímero [51], así como de la fosforilación irreversible de un residuo de Thr en el asa de activación de la subunidad catalítica α , efectuada por cinasas río arriba en la cascada de transducción de señales.

Una vez fosforilada, la unión de AMP favorece la activación alostérica del complejo. Las proteínas cinasas SAK1, ELM1 y TOS3 efectúan la fosforilación de SNF1, en tanto que LKB1 y CaMKK2 realizan el proceso en animales [24]. En *Arabidopsis thaliana*, se determinó la existencia de las cinasas AtSnAK1 y AtSnAK2 (SnRK1 Activating kinases) capaces de activar al complejo. Recientemente, estudios de complementariedad utilizando la triple mutante *pak1/tos3/elm1* mostraron que las proteínas GRIK1 y GRIK2 (Geminivirus Rep-interacting kinases 1 y 2) son capaces de reemplazar funcionalmente a cinasas encargadas de activar al complejo SNF1 en levaduras, lo que sugiere que en *Arabidopsis*, estas cinasas regulan diversos procesos durante el desarrollo temprano de la planta y median la infección por geminivirus al activar al complejo SnRK1 [52].

Típicamente, concentraciones del orden μM de AMP se requieren para la activación de los complejos. Bajo condiciones de estrés nutricional, estrés salino, isquemia, ejercicio y bajas concentraciones de glucosa, se suprime la autoinhibición de las subunidad α en las proteínas cinasas AMPK/SNF1/SnRK1. Se tiene evidencia de que en levaduras la subunidad SNF4 se une a la subunidad catalítica, ocasionando un cambio conformacional en el dominio de autoinhibición de SNF1, que a su vez promueve la liberación del sitio catalítico, haciéndolo susceptible a la fosforilación.

De igual forma, el AMP actúa como activador alostérico directo tanto del complejo AMPK como de la cinasa río arriba AMPKK [53], al tiempo en que inhibe la desfosforilación del residuo Thr¹⁷² por acción de fosfatasa [54]. Los motivos CBS en la subunidad γ interactúan de acuerdo a lo establecido anteriormente con nucleótidos de adenosina AMP/ATP, en respuesta al nivel energético celular.

Al disminuir la relación AMP/ATP, se favorece la ocupación de los sitios de unión por AMP, en cambio, si la relación aumenta, se favorecerá el desplazamiento del adenosin 5'-monofosfato por ATP, al menos en los sitios CBS₁ y CBS₃, en el caso de la subunidad de animales. Se debe recordar que SNF4 une ADP en el sitio CBS₂ y ADP ó ATP en el CBS₄, aunque no existen evidencias bioquímicas que indiquen que la activación del complejo SNF1 sea dependiente de la presencia de nucleótidos [26]. Con la formación de enlaces tipo puente de hidrógeno, entre la subunidad γ de mamíferos y los adenilatos monofosfato, se establecen interacciones con la subunidad α , al tiempo en que se potencializa la unión de la subunidad α con el resto del complejo para favorecer

su activación por mecanismos de fosforilación al convertirse el complejo, en un buen sustrato para cinasas río arriba [55].

Un requerimiento extra para la activación de los complejos AMPK/SNF1/SnRK1, consiste en la inhibición concomitante de fosfatasa. Si bien la actividad de las fosfatasa involucradas en esta regulación de los complejos ha sido someramente estudiada, se sabe que PP2A (Protein phosphatase-2A) o PP2C (Protein phosphatase-2C) se encargan de la desfosforilación de la Thr¹⁷² en animales [24], mientras que en el caso de levaduras REG1-GLC7 lleva a cabo el proceso sobre Thr²¹⁰ [2]. En plantas, no se han encontrado fosfatasa específicas que regulen al complejo SnRK1.

Actualmente, el mecanismo de activación alostérica por AMP en SnRK1 se desconoce, sin embargo se sabe que en las plantas la activación de SnRK1 responde igualmente a un déficit energético bajo condiciones de estrés, como la deficiencia nutrimental.

Se ha establecido que el complejo también es regulado por la presencia de carbohidratos mediante el dominio GBD/SBD presente en la subunidad β . Plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* sobreproductoras de la subunidad AKIN10, mostraron un decremento de la actividad de cinasa SnRK1 cuando fueron suplementadas con sacarosa y glucosa [34].

Función del complejo SnRK1 en condiciones de deficiencia de fósforo

Se tiene evidencia experimental de que la actividad tipo cinasa de SnRK1 en plantas desarrolladas durante escasez de fósforo decrece de manera importante. El estudio se efectuó en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* y mutantes carentes de la subunidad catalítica AKIN10 [36]. En condiciones de suficiencia de fósforo, las plantas silvestres y mutantes *akin10* presentaron niveles similares de actividad cinasa tipo SnRK1.

En deficiencia de fósforo, sin embargo, la actividad sufrió un decremento del 30 % en plantas silvestres y 48 % en las mutantes. Las plantas mutantes *akin10* no muestran una disminución completa en la actividad de cinasa SnRK1, lo que permite inferir la existencia de otros complejos SnRK1, conformados por otras subunidades catalíticas como AKIN11. En la Fig.14, se ilustra el papel metabólico del complejo SnRK1 como regulador energético global en plantas.

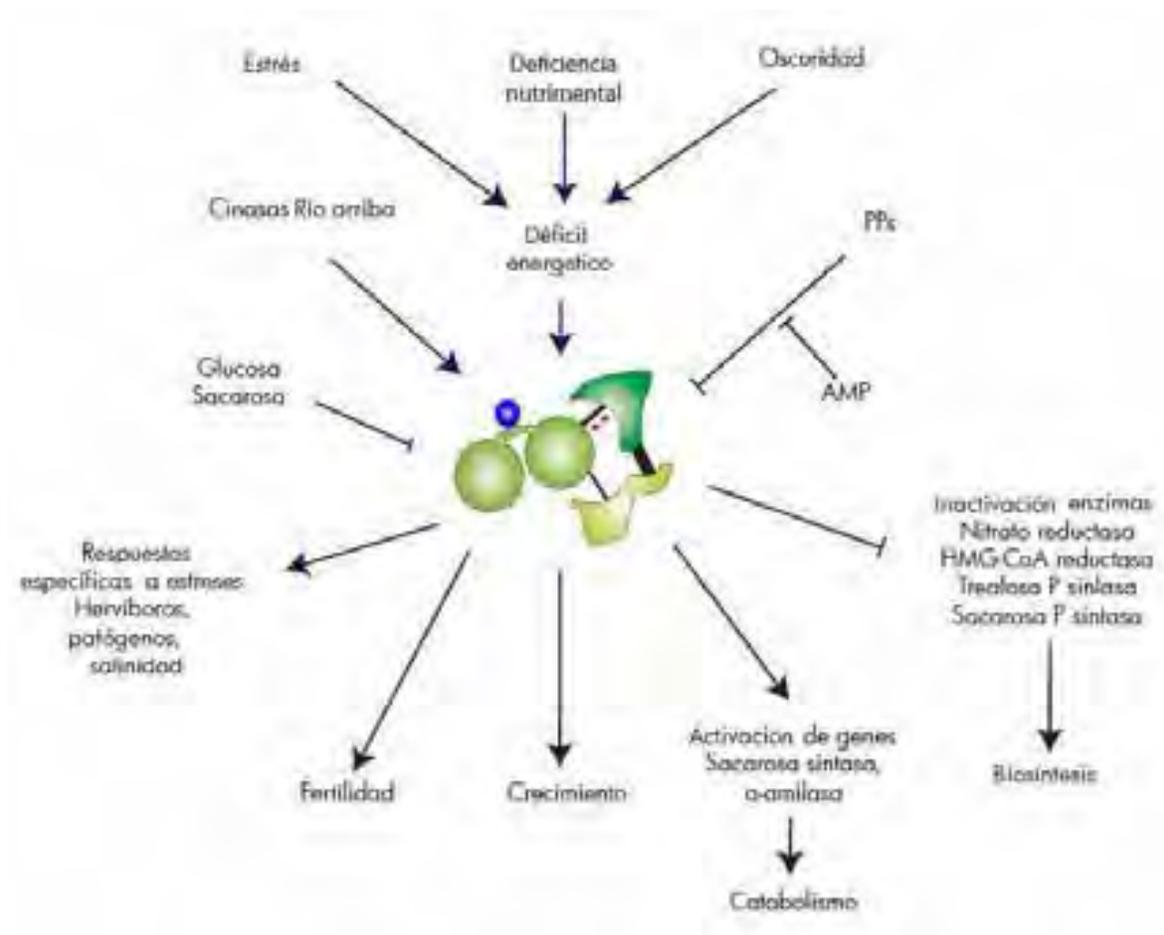


Fig. 14. En condiciones estresantes tales como la deficiencia nutricional y oscuridad, se estimula la activación del complejo heterotrimérico mediante la fosforilación de un residuo de Thr y la inhibición de fosfatasa, debido a la disminución en la relación AMP/ATP; SnRK1 inactiva enzimas clave en procesos biosintéticos, al tiempo en que favorece la activación de genes que codifican a proteínas implicadas en rutas catabólicas. Además, el complejo SnRK1 actúa positivamente durante el desarrollo de la planta [3].

Arabidopsis thaliana como modelo de trabajo

Arabidopsis thaliana es una de las nueve especies que componen al género *Arabidopsis*. Morfológicamente, se caracteriza por tener uno o varios tallos de entre 5 y 30 cm de altura, simples o ramificados. *Arabidopsis* posee hojas basales pecioladas organizadas en rosetas, con tricomas simples y estrellados cerca del tallo, con márgenes enteros, ondulados, serrados o dentados, con un ápex o punta de la hoja obtusa. Las escasas hojas de los tallos son sésiles o subsésiles (sin peciolo), lanceoladas, lineales, oblongas o elípticas, con márgenes enteros o ligeramente dentados, y con un ápex entre agudo y obtuso. Las flores tienen generalmente 4 pétalos de color blanco a lavanda, son espatulados, y los sépalos del cáliz son lisos o con tricomas simples. *A. thaliana* (Fig.15) ha sido ampliamente usada como organismo modelo en estudios de biología molecular, celular, genética y fisiología desde mediados del siglo pasado debido a las ventajas que presenta: un ciclo de vida corto, producción abundante de semillas, fácil cultivo, pero especialmente debido a la secuenciación de su genoma, así como a la existencia de mapas físicos de los 5 cromosomas que posee. Se clasifica taxonómicamente como *Eukaryota*; *Viridiplantae*; *Streptophyta*; *Embryophyta*; *Tracheophyta*; *Spermatophyta*; *Magnoliophyta*; *Eudicotyledona*, *Rosida*; *Eurosida II*; *Brassicales*; *Brassicaceae*; *Arabidopsis*.



Fig 15. Fotografía de las flores de *Arabidopsis thaliana*.

Fluorescencia

La luminiscencia se define como la emisión de luz debida a la relajación de los estados electrónicos excitados en una sustancia. Formalmente se divide en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado. En los estados singulete excitados el electrón en el orbital de mayor energía (excitado) está apareado con el segundo electrón del estado basal. Por lo tanto, el decaimiento de la excitación es una transición permitida por reglas de intercambio de espín, y ésta ocurre con la emisión de un fotón. Las tasas de emisión en fenómenos de fluorescencia se encuentran característicamente a 10^8 s^{-1} , por lo que el tiempo en el que se presenta una transición efectiva entre los estados basal y excitado se aproxima a los 10 ns. La fosforescencia es, en cambio, la emisión de luz a partir de estados triplete excitados, en los cuales el electrón en el orbital excitado posee el mismo spin que el electrón en el estado basal. Las transiciones al estado basal están prohibidas, por lo que se requiere de mecanismos alternos de desexcitación radiativa, por lo que las tasas de emisión son bajas ($10^{-3} - 10^0 \text{ s}^{-1}$); el tiempo de vida de los fenómenos fosforescentes se presenta a escala de milisegundos a segundos. Los núcleos orgánicos aromáticos típicamente fluorescen, por lo que se les considera fluoróforos. Algunos de los ejemplos más ampliamente reconocidos son el antimalárico quinolina, el naranja de acridina empleado en la tinción de DNA y las cumarinas empleadas en pruebas fluorogénicas como ELISA (Fig.16). Los datos en espectroscopia de fluorescencia se presentan generalmente en la forma de espectros de emisión, que consisten en gráficos de la intensidad de fluorescencia contra la longitud de onda de excitación (nm) o contra el número de onda (cm^{-1}). Los espectros de emisión varían ampliamente ya que dependen de la estructura química del fluoróforo y de las interacciones del mismo con el disolvente [56].

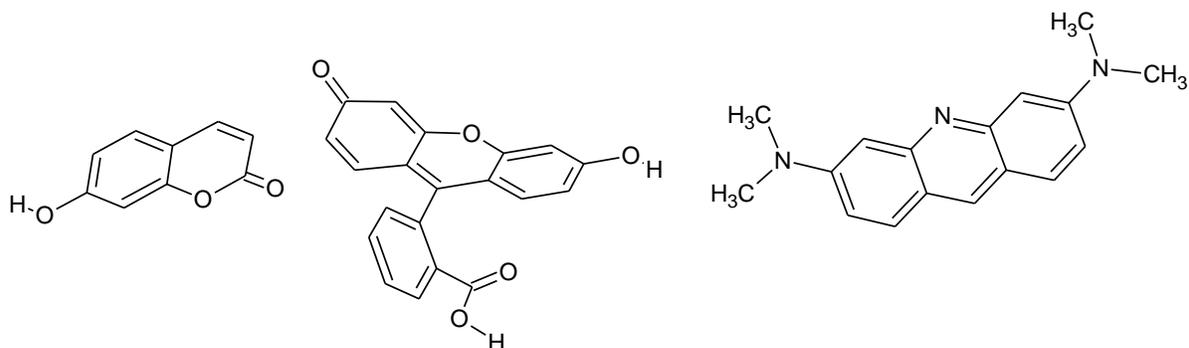


Fig 16. Estructuras de fluoróforos típicos. De izquierda a derecha: 7-hidroxicumarina (unbeliferona), fluoresceína y naranja de acridina.

En proteínas, la fluorescencia es una propiedad intrínseca de residuos de aminoácidos aromáticos como el Trp y resulta de gran utilidad en el monitoreo de los microambientes electrónicos de una proteína al proporcionar inclusive información sobre cambios conformacionales. Experimentalmente, para realizar ensayos de fluorescencia intrínseca se requiere que los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas se encuentren en las regiones de interés pero no próximos espacialmente, para evitar fenómenos de transferencia de carga o *quenching* y en consecuencia ocasionar un apagamiento de la fluorescencia.

Como se ha dicho, los residuos de fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W), fluorescen al ser excitados por la radiación electromagnética en la región UV del espectro. La fluorescencia de fenilalanina (F) en presencia de tirosina (Y) y triptófano (W) no se detecta debido al bajo rendimiento cuántico de su fluorescencia en disolución (0.04 para F, en comparación con 0.20 y 0.21 para W y Y respectivamente). La fluorescencia de los residuos de tirosina (Y) presenta un apagamiento parcial o total si este residuo se encuentra ionizado, cerca de grupos amino y carboxilo o residuos de triptófano [57].

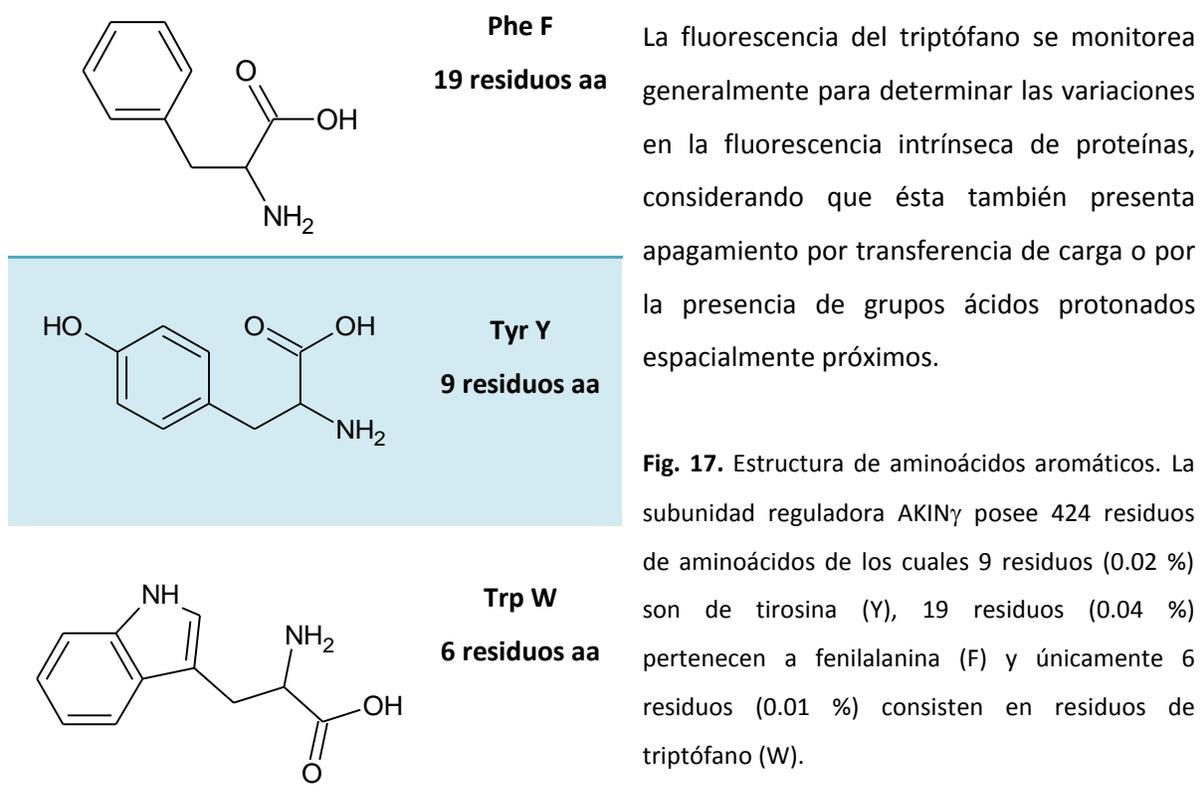


Fig. 17. Estructura de aminoácidos aromáticos. La subunidad reguladora AKIN γ posee 424 residuos de aminoácidos de los cuales 9 residuos (0.02 %) son de tirosina (Y), 19 residuos (0.04 %) pertenecen a fenilalanina (F) y únicamente 6 residuos (0.01 %) consisten en residuos de triptófano (W).

Antecedentes

Al someter plantas de *Arabidopsis thaliana* a estrés por deficiencia de nutrientes esenciales se desencadena una respuesta de carácter bioquímico que permite mantener la homeostasis del organismo y asegura su supervivencia. Nuestro grupo de trabajo ha obtenido evidencias que indican que las cinasas SnRK1 se encuentran involucradas en la respuesta metabólica a condiciones estresantes, tal como sus homólogos AMPK de animales y SNF1 en levaduras.

Al analizar las subunidades catalíticas α fusionadas a GFP, se determinó que las proteínas AKIN10 y AKIN11 presentan localización cloroplástica, aunque en menor cantidad, también se localizan en el citoplasma. De igual forma, se estableció que la actividad de AKIN10 se ve incrementada durante el estrés nutrimental por escasez de fosfato; el mecanismo mediante el cual se modifica la actividad de dicha subunidad no depende de la fosforilación del residuo de Thr¹⁷² por una cinasa río arriba.

La subunidad AKIN11 es degradada específicamente en condiciones de deficiencia de fósforo, por lo que se infiere que únicamente AKIN10 forma parte de los complejos heterotriméricos formados durante la escasez del nutriente. Los datos generados sugieren que ambas subunidades son reguladas bajo dichas condiciones.

En el caso de la subunidad AKIN $\beta\gamma$, también caracterizada por este grupo de trabajo, se demostró que presenta una localización cloroplástica e interactúa con las subunidades catalíticas antes mencionadas, determinándose además, que esta proteína atípica se encuentra asociada a gránulos de almidón en conjunto con la subunidad AKIN10.

Hipótesis

La expresión de la subunidad AKIN γ en Arabidopsis thaliana se modifica en respuesta a condiciones de estrés por deficiencia de fósforo; así mismo, se espera que la localización subcelular de la proteína, sea consistente con la de las subunidades catalíticas AKIN10 y AKIN11 y la subunidad atípica $\beta\gamma$. Finalmente, se espera que la subunidad reguladora y retenga la capacidad de enlazar nucleótidos de adenosina, al igual que sus homólogos en animales y levaduras.

Justificación

La aplicación de fertilizantes afecta diversas propiedades de los suelos, siendo el efecto más conocido el cambio de pH inducido. La fertilización fosfatada, cuando es continua en largos períodos de tiempo, puede causar incluso la acumulación de elementos traza en los suelos; esto se debe a la presencia de impurezas de la materia prima (roca fosfórica). Los elementos traza, que se encuentran en concentraciones variables, persisten en los fertilizantes comerciales que son portadores de Cd, Zn, Co, Cu, Cr, Ni, Pb, F y muchos otros elementos [58] que no sólo se acumulan en los suelos sino que, dado que algunos cationes como el Cd (II) poseen formas solubles en fertilizantes, su utilización prolongada implicaría una mayor absorción de contaminantes por los cultivos [59].

La presente investigación, aunada a resultados previos del grupo de trabajo, abre posibilidades de probable interés ecológico y comercial, al estudio de los mecanismos de regulación y las modificaciones metabólicas que efectúan las cinasas bajo condiciones de estrés por deficiencia de fósforo en el crecimiento de cultivos.

El desarrollo de organismos resistentes a suelos pobres en nutrientes fosfatados dependerá, en gran medida, de los avances en caracterización completa de la familia de las SnRKs, lo que a largo plazo evitará el uso de fertilizantes en tierras de cultivo con escasez de fósforo y en suelos pobres en otros nutrimentos.

Objetivo General

Estudiar la subunidad reguladora AKIN γ del complejo heterotrimérico de la familia SnRK1 en *Arabidopsis thaliana*.

Objetivos particulares

- ✿ Inmunodetectar la proteína AKIN γ mediante la técnica de Western blot en tejidos de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones normales y de estrés por deficiencia de fósforo, e inmunolocalizarla en cortes de tejido mediante microscopía confocal.
- ✿ Clonar y sobreexpresar el gen AT3G48530 que codifica a la proteína AKIN γ en células de *E. coli*.
- ✿ Determinar, por medio de ensayos de fluorimetría, si la subunidad reguladora AKIN γ une selectivamente nucleótidos de adenosina (AMP).
- ✿ Realizar un modelo estructural confiable de la proteína AKIN γ mediante métodos HMM (modelos markovianos ocultos) y dinámica molecular MD.
- ✿ Trazar un árbol filogenético que permita elucidar la relación evolutiva entre las subunidades reguladoras AKIN γ , AKIN β y AKIN $\beta\gamma$.

Materiales

Electroforesis en agarosa para ácidos nucleicos

Los geles se prepararon al 1 % en peso de agarosa en amortiguador TAE 1x [Tris-HCl 40 mM, CH₃CO₂H glacial 20 mM, EDTA 1 mM pH 8.0] y bromuro de etidio 1 µg/mL. Como amortiguador de carga se utilizó Ficoll 10x [en disolución acuosa con 0.25 % en peso de azul de bromofenol C₁₉H₁₀Br₄O₅S, 0.25 % en peso de xilen cianol FF C₂₅H₂₇N₂NaO₆S₂ y 0.25 % en peso de Ficoll® 400]. La electroforesis se corrió aplicando un potencial de 100 V al sistema.

Electroforesis SDS-PAGE

Se preparó un gel concentrador de poliacrilamida al 4 % [3.17 mL de H₂O, 1.25 mL de Tris-HCl 1M pH 6.8, 50 µL SDS (dodecil sulfato de sodio) 20 %, 0.5 mL de acrilamida/bis-acrilamida, 50 µL de (NH₄)₂S₂O₈ 10 % y 10 µL de TMEDA] y un gel separador de poliacrilamida al 10 % [3.94 mL de H₂O, 2.5 mL de Tris-HCl 1 M pH 8.8, 100 µL SDS 20 %, 3.4 mL de acrilamida/bis-acrilamida, 100 µL de (NH₄)₂S₂O₈ 10 % y 10 µL de TMEDA]. No se empleó β-mercaptoetanol (HSCH₂CH₂OH). Para correr la electroforesis se aplicó un potencial eléctrico de 125 V.

Tinción de geles de poliacrilamida

Los geles se tiñeron con una disolución del colorante de Coomassie R [0.625 g de azul brillante, 25 mL de CH₃CO₂H, 125 mL de MeOH y 100 mL de H₂O] durante 20 min con agitación constante, transcurridos los cuales se retiró el colorante y se adicionó disolución para desteñir [MeOH 200 % y CH₃CO₂H 7.5 % en 725 mL de H₂O] y se lavó durante 24 h.

Tinción de membranas con disolución de Rojo de Ponceau

La disolución de rojo de Ponceau [1 % en peso del colorante S de Ponceau $C_{22}H_{12}N_4Na_4O_{13}S_4$ y 0.1 % en volumen de CH_3CO_2H glacial] se emplea en la tinción de membranas de nitrocelulosa y polivinilidenofluoruro para la detección de proteínas. El exceso de colorante se lavó con H_2O destilada.

Medio LB y Antibióticos

Se disolvieron 20 g/1L de Medio LB Broth SIGMA® y se ajustó a pH 7.5 con el potenciómetro. Se emplearon disoluciones patrón de D-(-)- α -aminobencilpenicilina (Ampicilina $C_{16}H_{19}N_3O_4S$) y disulfato de kanamicina en concentraciones 75 mM y 45 mM respectivamente.

Material biológico

Las plantas *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia empleadas en los ensayos de inmunolocalización de la subunidad reguladora AKIN γ del complejo SnRK1 se cultivaron en tierra comercial Metro mix 200®. Se sembraron semillas de plantas silvestres WT en macetas y se colocaron a 4° C, en ausencia de luz durante dos días para uniformar el proceso de germinación. Posteriormente, se ubicaron en el invernadero a aproximadamente 20° C, en condiciones de fotoperiodo corto (16 h de oscuridad por 8 h de luz).

Para el tratamiento de deficiencia nutrimental, se seleccionaron plantas de tres semanas de crecimiento y se trasplantaron a agrolita, un vidrio volcánico amorfo con alto contenido en H_2O y altamente permeable al aire; tras una semana se suplementaron con medio Hoagland sin fosfatos [6 mM KNO_3 , 4 mM $Ca(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$, 1 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $Mg(SO_4)_2 \cdot 7H_2O$, 9 μM $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 46 μM HBO_3 , 8 μM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 μM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1 mM $H_2MoO_4 \cdot H_2O$, 0.01 $g L^{-1}$ Fe (III)-EDTA]. Muestras de tejidos aéreos y raíces de plantas desarrolladas en condiciones normales y en deficiencia de fósforo se colectaron aproximadamente 10 días después del tratamiento, se congelaron con N_2 líquido y se almacenaron a -70° C.

Metodología

Clonación de AKIN γ en el vector de expresión pEt101-D

Cepas de *Escherichia coli* que contenían el plásmido pENTR-TOPO[®] con el inserto de AKIN γ , fueron estriadas en cajas con ampicilina durante 24 h a 37° C. Al crecer colonias aisladas se efectuó una purificación del DNA plasmídico obteniéndose aproximadamente 30 μ g del mismo, empleando el producto Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit[®] por el método de lisis alcalina. Inicialmente se inocularon 5 mL de medio LB con ampicilina como antibiótico, con una muestra de bacterias *E. coli* con el vector pENTR-TOPO con el inserto del gen AT γ ; los tubos se colocaron en agitación constante a 37° C por una noche. Las células se centrifugaron a 5 375 g (Eppendorf Centrifuge[®] 5417 C) y se desechó el sobrenadante; a las pastillas celulares obtenidas se agregaron 250 μ L del amortiguador de resuspensión con RNasa A y 250 μ L del amortiguador de lisis, la muestra se transfirió a un tubo Eppendorf y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente.

A continuación se adicionaron 350 μ L del amortiguador de precipitación y se agitó suavemente por inversión para favorecer la precipitación del DNA; en seguida, se centrifugó la muestra a 15 300 g durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a una columna Spin[®] empacada con SiO₂. Tras centrifugar a 15 300 g durante 1 min, se añadieron 700 μ L del amortiguador de lavado con EtOH a la columna y nuevamente se centrifugó a las condiciones previamente enunciadas, hasta eliminar el sobrenadante. Finalmente se agregaron 75 μ L del amortiguador TE a 75° C a la columna montada sobre un tubo Eppendorf nuevo y se centrifugó a 15 300 g durante 2 min para recuperar el DNA plasmídico. El procedimiento se repitió variando la elución final del plásmido de interés a partir de la columna, al adicionar 75 μ L de H₂O estéril. La muestra así recuperada se envió a secuenciar en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para verificar la identidad del inserto con el gen que codifica a la subunidad AKIN γ .

Además, el inserto contenido en el plásmido se amplificó mediante PCR [5 μ L amortiguador 10x, 1.5 μ L MgCl₂ 6 mM, 1 μ L dNTP's 10mM, 1 μ L cDNA muestra, 1 μ L oligonucleótido Fw 10 μ M y 1 μ L oligonucleótido Rv 10 μ M, 0.3 μ L Taq polimerasa en un volumen final de 50 μ L], los oligonucleótidos Fw y Rv utilizados corresponden a las secuencias 5'-CACCATGGCGACTGTTCCGGAG-3' (Tm 72°C) y 5'-GACTCGGTAGTTTTTCGGGAAG-3' (Tm 64° C)

Ensayos preliminares de inducción de la expresión y purificación de AKIN γ

Para determinar las condiciones ideales de expresión de la proteína en células de *E. coli* BL21 se crecieron bacterias transformadas de la colonia 1-pET101D- γ en dos tubos con 5 mL de medio líquido LB con ampicilina y se incubaron a 37° C durante 12 h. Transcurrido dicho tiempo el contenido de los tubos se vertió en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 45 mL de medio; las bacterias se dejaron crecer hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 0.8 a una longitud de onda de 600 nm. En seguida, a cada matraz se adicionó un volumen de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido IPTG (un análogo estructural de la alolactosa que regula el operón lac) tal que la concentración final fuera de 0.5 mM y 1.0 mM, permitiendo proceder la incubación durante 3 h en agitación constante.

Los cultivos se centrifugaron a 7 996 g (Sorvall RC-5B con el rotor de ángulo fijo GSA 14.61 cm), para formar paquetes celulares, que posteriormente se resuspendieron en 3 mL de amortiguador de fosfatos K_2HPO_4/KH_2PO_4 50 mM, 300 mM de NaCl y 10 mM de imidazol y se sonicaron a una amplitud no mayor al 30 % para favorecer la ruptura de las membranas y liberación de las proteínas intracelulares al centrifugar nuevamente. Se tomaron muestras del sobrenadante y se cargaron en un gel de electroforesis SDS-PAGE con los controles respectivos sin IPTG; para verificar la expresión mayoritaria de la proteína se llevó a cabo un ensayo Western blot. Se repitió el mismo ensayo para el caso de la colonia 2-pET101D- γ de transformantes.

Tras establecer las condiciones óptimas de expresión de la proteína, se efectuó un ensayo inicial de purificación con una columna comercial de Ni-NTA, eligiéndose esa estrategia de purificación debido a que la proteína recombinante AKIN γ contenida en el plásmido TOPO pEt101-D presenta hacia el extremo carboxilo terminal una secuencia de 6 His capaces de coordinar al centro metálico dando paso a un compuesto de gran estabilidad. Se procedió a trabajar un cultivo de igual volumen inicial que el manejado anteriormente, para lo cual se inocularon 45 mL de medio LB con una muestra de bacterias transformantes y se indujo durante 3 h a 0.5 mM de IPTG, se centrifugó a 23 499 g y los paquetes celulares se resuspendieron en 1 mL de de amortiguador de fosfatos [K_2HPO_4/KH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 10 mM] y se sonicaron para lisar las células, centrifugándose a 16 319 g. Se adicionaron 250 μ L de la suspensión de Ni-NTA incubada

previamente durante 15 min con amortiguador [$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM], a 1 mL del sobrenadante obtenido y se dejó incubar a 4°C por 1 h con agitación por inversión para favorecer la formación de un complejo con la proteína AKIN γ . Transcurrido dicho tiempo, se montó una minicolumna previamente empacada con SiO_2 y se hizo pasar el sobrenadante con Ni-NTA evitando la formación de burbujas. Se adicionaron 5 mL del mismo amortiguador con el cual se equilibró la columna de tal forma que se favoreciera la pérdida de interacciones no coordinantes entre el Ni y proteínas que no presentaran una cola de His, finalmente se adicionaron 5 mL de amortiguador de fosfatos con NaCl pero con una concentración de imidazol 250 mM, para favorecer la sustitución de las His coordinadas al metal con los anillos imidazólicos, recuperándose fracciones de 0.5 mL.

Inducción de la sobreexpresión de AKIN γ (2L)

Se inocularon 2 L de medio LB con 15 mL de células de *E. coli* transformadas con el plásmido pEt101D- γ y se colocaron en agitación continua, hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 0.800 a una longitud de onda de 600 nm, enseguida se adicionó IPTG a una concentración final de 0.5 mM y se indujo por un periodo de 3 h a 37°C en condiciones de agitación óptima. Transcurrido dicho tiempo se centrifugó el contenido del matraz a 7 996 g durante 10 minutos; las pastillas se guardaron a -70°C durante una noche. Las pastillas celulares se resuspendieron en 15 mL de Amortiguador de lisis [50 mM de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 150 mM de NaCl, 10 mM de imidazol en 100 mL de H_2O desionizada] adicionando 150 μL de un *cocktail* de inhibidores de proteasas en DMSO (Sigma). Las células se sonicaron al aplicar 3 pulsos de 10 segundos al 30 % de amplitud. En seguida se centrifugaron durante 20 min a 16 319 g. Posteriormente se filtró el sobrenadante a través de una membrana de 0.45 μm .

Purificación de AKIN γ con Ni-NTA mediante FPLC

Se colocaron 15 mL de la suspensión comercial Ni-NTA[®] en una columna para FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography o cromatografía rápida de proteínas en fase líquida) y se equilibraron con una disolución de imidazol 100 mM [amortiguador de fosfatos $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, NaCl 300 mM]. En seguida, se adicionaron 15 mL del sobrenadante obtenido a la columna empacada con Ni

(II) previamente montada en el sistema cromatográfico. Se aplicó un gradiente inicial de imidazol, partiendo de una concentración de 50 mM hasta alcanzar 100 mM de la sal orgánica, el lavado se colectó en una sola fracción de 10 mL. En seguida, se empleó un segundo gradiente (100 mM a 300 mM de imidazol), recuperándose 20 fracciones de elución de 0.5 mL. Finalmente se aplicó un tercer gradiente hasta alcanzar una concentración final de 500 mM del 1,3-diaza-2,4-ciclopentadieno, que se recuperó en una sola fracción de 10 mL.

Purificación de AKIN γ con Ni-NTA (procedimiento alternativo)

Se colocaron 1.5 mL de la suspensión comercial Ni-NTA[®] en una columna de 10 mL previamente empacada con SiO₂ y se equilibró con 10 mL de amortiguador pH 7.8 [KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM + NaCl 150 mM] adicionado con imidazol al 10 mM. En seguida, a partir de un generador de gradientes se hicieron pasar por la columna equilibrada 10 mL del sobrenadante obtenido a partir de 2 L de medio de cultivo. Se efectuó un lavado inicial de 15 mL con el amortiguador al cual se equilibró la columna de concentración 10 mM de imidazol que se recuperó en una sola fracción; a continuación se impuso un gradiente en concentraciones crecientes de imidazol hasta alcanzar una concentración final de 250 mM de la sal orgánica, recuperándose 20 fracciones de elución de 0.5 mL.

Eliminación de imidazol

Una vez identificadas las fracciones de elución en las que se recuperó la proteína AKIN γ , éstas se colocaron en volúmenes de 500 μ L en centricones Amicon 30K Millipore[®] y se adicionaron 3.5 mL de amortiguador 50 mM de KH₂PO₄/K₂HPO₄ y 150 mM de NaCl, en seguida se centrifugó a 4 080 g durante 30 min a 10° C. El procedimiento se repitió cuatro veces, recuperándose los lavados en cada ensayo. La proteína se resuspendió en 500 μ L del mismo amortiguador a 4° C. La eliminación del imidazol se monitoreó por espectroscopia UV/Visible en el espectrofotómetro Perkin-Elmer, hasta obtenerse una relación A²⁸⁰/A²⁶⁰ de 1.0. La relación óptima A²⁸⁰/A²⁶⁰ debe ser de 2.0, sin embargo no fue posible disminuir la contribución de la absorbancia a 260 nm, aún llevando a cabo lavados adicionales.

Almacenamiento de AKIN γ

A las muestras resuspendidas de AKIN γ se adicionó glicerol HOCH₂CH(OH)CH₂OH al 10 % como crioprotector y se colocaron a -20° C durante una noche.

Determinación de la unión de AMP por ensayos de fluorometría

Se monitorearon las variaciones en la intensidad de fluorescencia intrínseca de la proteína AKIN γ (dependiente de los residuos de aminoácidos que presentan grupos aromáticos) en presencia de adenosin 5'-monofosfato para lo cual se emplearon 125 μ L de una disolución patrón de AKIN γ de concentración 0.2500 mgmL⁻¹ de la proteína en el amortiguador de KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM y NaCl 150 mM, se adicionaron 275 μ L del mismo amortiguador para llevar la proteína a un volumen final de 400 μ L de acuerdo a las especificaciones de la celda requerida por el fluorómetro Shimadzu®. La pureza de la disolución de la proteína se estableció mediante SDS-PAGE, tiñendo con azul de Coomassie. La concentración inicial de AKIN γ se determinó usando el coeficiente de absortividad molar calculado a partir de la secuencia de aminoácidos por el servidor ExPasy (**Expert Protein Analysis System**) www.expasy.ch/.

Se adicionaron concentraciones crecientes de AMP a partir de una disolución patrón de 20 mM en el intervalo de 1 μ M hasta 150 μ M. Para determinar el efecto del filtro interno en las variaciones de la fluorescencia intrínseca de la proteína, se repitió el ensayo pero adicionando volúmenes del amortiguador KH₂PO₄/K₂HPO₄ 50 mM y NaCl 150 mM iguales a los agregados previamente de la disolución de AMP. Los ensayos de fluorometría y los controles respectivos se llevaron a cabo en presencia de glicerol al 10 % (v/v), los estudios se efectuaron a 20° C a una longitud de onda de emisión a 296 nm y 320 nm. La fluorescencia de AKIN γ se registró en un intervalo de 300-400 nm.

Los datos experimentales fueron digitalizados a partir del espectro, empleando el programa WinDig [Dominique Lovy, Express Compression Laboratories]. Los datos crudos se ajustaron mediante regresión no lineal usando el paquete Origin 7.0 [Microcal] y empleando la ecuación [1], en la que F_0 es la fluorescencia en ausencia de ligando, F_∞ es la fluorescencia a una

concentración infinita de ligando, L_{50} es la concentración de ligando que produce el 50 % del apagamiento máximo posible con dicho ligando y L es la concentración de ligando añadido. Con el tratamiento matemático es posible obtener el valor de la afinidad media de la proteína por el ligando, al aproximar el valor de L_{50} mediante regresión no lineal, empleando un método estadístico que permite sustituir los puntos experimentales por el valor de la media e incluye el error estándar como barras de error.

$$[1] \quad F = F_{\infty} + (F_0 - F_{\infty}) \left(\frac{L_{50}}{L_{50} + L} \right)$$

La expresión [2] se emplea para corregir los valores de IF con los valores de absorbancia del AMP a 295 y 320 nm.

$$[2] \quad \Delta IF^* = IF \left(\frac{\Delta A_L^{320} - \Delta A_L^{295}}{2} \right)$$

Immunodetección por Western blot de AKIN γ en tejidos de *Arabidopsis thaliana*

Los extractos de tejidos de *A. thaliana*, en condiciones de suficiencia y deficiencia de P, a emplear en los ensayos de inmunolocalización de AKIN γ se prepararon al macerar los tejidos, adicionando 300 μ L de amortiguador de lisis [Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Na₄EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na₃VO₄ 1mM, NaF 50 mM, β -glicerol fosfato C₃H₇Na₂O₆P·5H₂O 1 mM] adicionado con inhibidores de proteasas [hemisulfato de leupeptina C₂₀H₃₈N₆O₄ · 1/2H₂SO₄ 1mM, benzamidina C₆H₅C(=NH)NH₂ 1 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo PMSF C₇H₇FO₂S 1 mM]. Las muestras se transfirieron a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 19 125 g durante 10 min a 4° C. La cantidad de proteína presente en los extractos se determinó mediante un ensayo de Bradford, cargándose una cantidad equivalente de las muestras en un gel de electroforesis SDS-PAGE al 10 % y se realizó la transferencia inmediata de las proteínas separadas en el gel a una membrana de polivinilidenofluoruro Immobilon-P Millipore® por la imposición de un potencial de 100 V, durante 1 h con agitación constante y en frío en el sistema húmedo de BioRad.

La membrana se activó de manera previa al procedimiento, al ser sumergida en MeOH grado industrial por aproximadamente 30 segundos. Una vez efectuada la transferencia de proteínas, la membrana se tiñó con una disolución de rojo de Ponceau y se lavó con H₂O destilada para retirar el exceso de colorante. La membrana se bloqueó en 20 mL de una disolución de PBST 1x [NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 1.8 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM pH 7.4 y 0.1 % en volumen de Tween-20] adicionada con leche Svelty® [5 %] durante 1 h, la incubación con el anticuerpo contra AKIN γ en dilución 1:7000 procedió por un periodo de 18 h a 4° C en agitación continua.

Transcurrido el periodo de incubación, se realizaron lavados sucesivos de 2x5 min con 20 mL de PBST 1x, 1x15 min de una disolución NaCl 1 M en PBST 1x y nuevamente 2x5 min con PBST 1x. La incubación con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa Amersham ECL® en dilución 1:40 000 se efectuó durante 1 h a temperatura ambiente, transcurrida la cual, se realizaron nuevamente tres lavados de 3x10 min. La detección por quimioluminiscencia se llevó a cabo utilizando el producto Amersham ECL® Western Blotting Detection Reagents.

Para determinar la localización celular y subcelular de la proteína AKIN γ en condiciones de suficiencia de fósforo, se realizaron observaciones por microscopía confocal de cortes de tejidos aéreos y raíces de plantas de *Arabidopsis thaliana* en el microscopio Olympus FluoView® 1000, en la Unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Para la detección de la subunidad reguladora de interés se empleó un segundo anticuerpo Goat anti-mouse IgG® pH 7.2 de Invitrogen, acoplado al colorante fluorescente Alexa^{λ568} de coloración rojo-anaranjado, excitada preferentemente a 568 nm por la línea espectral de Ar-Kr.

Los cortes de tejido, realizados en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, se colocaron a 60° C durante aproximadamente 1 h y se lavaron con el disolvente Citrisolve®, para eliminar las parafinas con las cuales se fijaron las muestras, en seguida, se rehidrataron al colocarlos sucesivamente en disoluciones de EtOH absoluto, EtOH al 96 %, EtOH 70 % y finalmente en amortiguador PBS durante 40 min. Los cortes se bloquearon en una disolución de BSA 3 %, NaN₃ 0.01 %, Triton X-100 0.1 % en PBS durante 3 h, a temperatura ambiente.

La incubación con el primer anticuerpo a una dilución de 1:1000, se realizó en la misma solución de bloqueo empleada antes a 4° C, durante toda la noche. Los cortes se lavaron 3x con PBS y la incubación con el segundo anticuerpo acoplado a Alexa⁵⁶⁸ se llevó a cabo durante 4 h en condiciones de oscuridad. Transcurrido dicho tiempo, se realizaron 4 lavados de 10 min cada uno

con PBS. A los cortes se adicionó una gota de disolución comercial de montaje y se cubrieron con cubreobjetos. Finalmente, las preparaciones se sellaron con barniz de uñas y se almacenaron a 4° C en la oscuridad hasta su visualización. En cada caso, se prepararon controles incubados con el suero preinmune.

Resultados y discusión

Microarreglos e inmunolocalización de AKIN γ en tejidos de *Arabidopsis thaliana*

La base de datos de microarreglos Genevestigator [60] es un sistema de análisis empleado como referencia para conocer la expresión y regulación de diversos genes en diferentes condiciones, ya que agrupa los datos de un número significativo de experimentos de microarreglos, permitiendo realizar diversos tipos de análisis de los mismos, sobre un conjunto de genes seleccionados por el usuario. Los meta estudios son empleados para elucidar la importancia de la respuesta metabólica frente a diferentes estímulos involucrados directamente con la regulación genética. Los resultados obtenidos de la base de datos Genevestigator, indican que el gen que codifica a la proteína AKIN γ mantiene sus niveles de transcrito primario comparativamente constantes en los diferentes tejidos y estadios de desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. Tal como se observa en la Fig.19, en las silicuas y flores la presencia de transcrito es mayor que en el caso de hojas. Lo mismo puede afirmarse con respecto a las raíces.

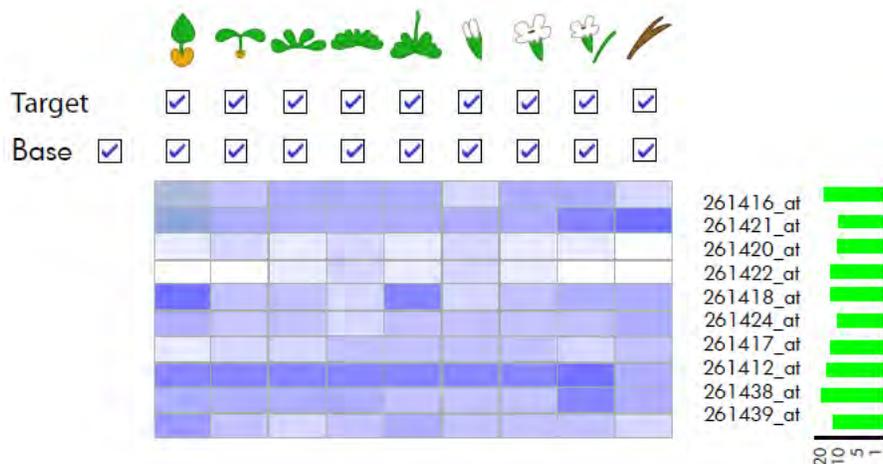


Fig.19. Análisis por microarreglos de la presencia del transcrito del gen que codifica a la subunidad AKIN γ en diferentes estadios y tejidos de *Arabidopsis thaliana* en condiciones de suficiencia de fósforo. El color azul es indicativo de la cantidad relativa del mensaje en los diferentes tejidos. En el histograma dispuesto a la derecha se ilustran los datos de la cantidad relativa del transcrito de diferentes fragmentos del cDNA de AKIN γ .

Western blot

Los ensayos de Western blot efectuados para inmunodetectar la proteína AKIN γ en tejidos aéreos de *Arabidopsis thaliana* en suficiencia y deficiencia de fósforo se llevaron a cabo a diferentes diluciones del primer anticuerpo contra la proteína. Se determinó inicialmente que las condiciones más favorables se presentaron al manejar una concentración del anti-AKIN γ de 1:7000, revelando por quimioluminiscencia con el reactivo ECL Amersham® acoplado a peroxidasa.

Los resultados de Western blot presentados en la Fig.20 muestran que AKIN γ se encuentra presente en los tres tipos de tejidos aéreos evaluados. La banda relativa a la proteína de interés se observa en un peso intermedio entre los marcadores de 75 y 50 kDa. Se aprecian también otras bandas, que podrían corresponder con señales inespecíficas o fragmentos de degradación.

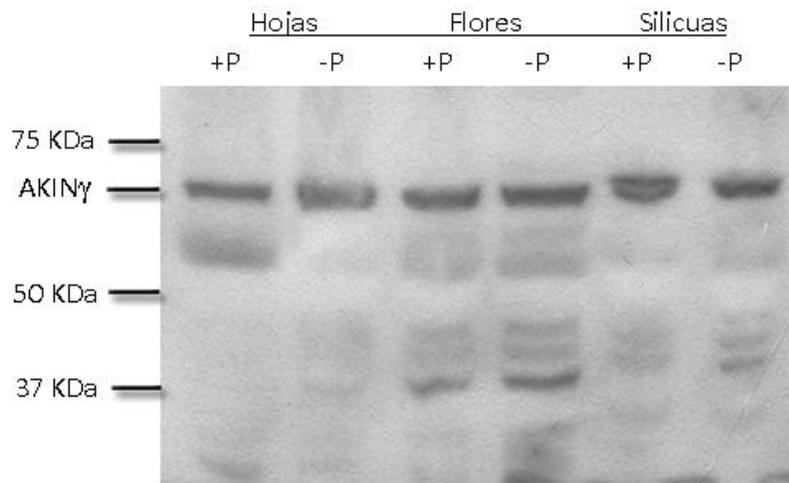


Fig.20. Western blot de los tejidos aéreos de plantas crecidas en suficiencia y deficiencia de fosfatos. Cada carril contiene aproximadamente 15 μ g de proteína.

La subunidad AKIN γ no se encuentra en el peso molecular esperado de aproximadamente 50 kDa. Probablemente, la proteína sufra modificaciones postraduccionales *in vivo*, siendo sin embargo, una evidencia indirecta. De igual forma, se puede observar una cantidad considerablemente mayor de proteína AKIN γ en los tejidos aéreos de plantas desarrolladas en ausencia de fósforo, a pesar de que se cargaron 15 μ g de proteína total en cada carril.

Debe hacerse notar que en los carriles correspondientes a flores se presenta un número importante de bandas de bajo peso molecular que resultaron reactivas al anticuerpo contra AKIN γ . Algo similar sucede en caso de las silicuas o vainas, especialmente en el caso de las plantas desarrolladas en deficiencia nutricional. Estos resultados sugieren la degradación proteolítica de esta subunidad, la cual aparentemente se acentúa durante la deficiencia de fosfato inorgánico, particularmente en órganos reproductores.

Los ensayos de inmunodetección de AKIN γ en raíces también se realizaron en dilución 1:7000, tal como se ilustra en la Fig. 22. En ambos casos es posible apreciar una mayor cantidad de proteína durante el estrés por privación de fósforo; se puede afirmar que en las plantas que crecieron en suficiencia de este elemento la proteína se encuentra en menor concentración. En ésta ocasión no se observaron bandas de bajo peso molecular, lo que indica que la degradación de la proteína, en caso de ser fisiológicamente relevante, es minoritaria en dichos tejidos.

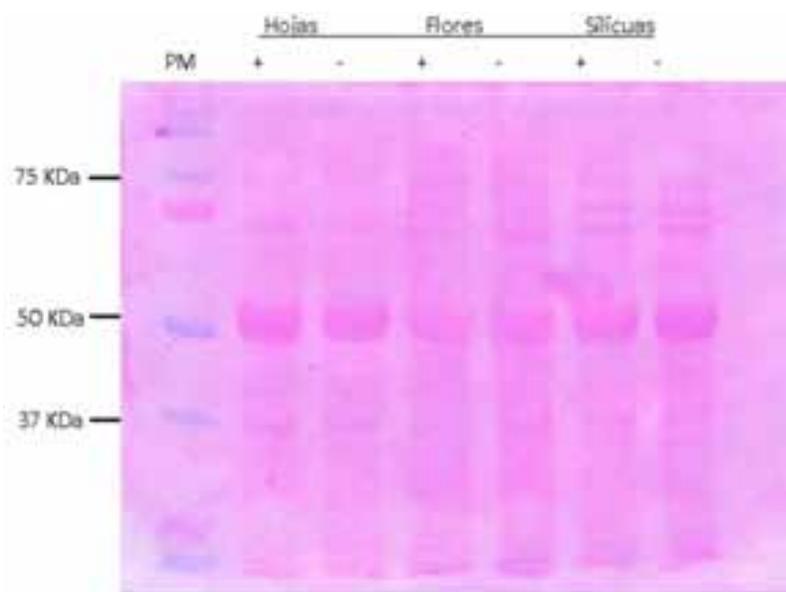


Fig. 21. Tinción de la membrana de polivinilideno fluoruro con colorante rojo de Ponceau. Se cargaron 15 μ g aproximadamente de proteína en los carriles relativos a extractos de hojas, flores y silicuas. En todos los extractos se observa la proteína rubisco en 50 kDa.

El resultado de mayor interés indiscutiblemente se deriva de la observación de que AKIN γ se encuentra en mayor cantidad en los tejidos de plantas desarrolladas en deficiencia de fosfato.

Finalmente, se debe comentar que la subunidad reguladora AKIN γ se expresa mayoritariamente en los tejidos aéreos de *Arabidopsis thaliana* con respecto a las raíces.

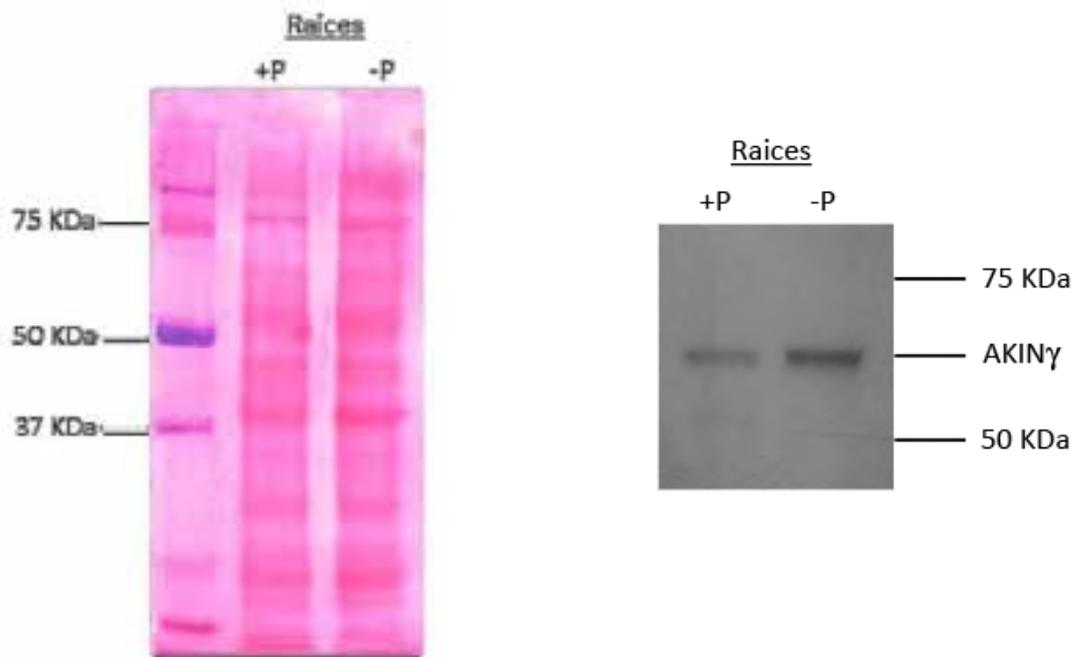


Fig. 22. Membrana teñida con el colorante Rojo de Ponceau y placa fotosensible revelada de los extractos individuales de raíces en dilución 1:7000 del anticuerpo contra AKIN γ . Se puede observar una cantidad considerablemente mayor de proteína en el carril -P.

Existen reportes en los que se evidencia que en *Arabidopsis thaliana* el complejo SnRK1 se encuentra asociado a AKP1/ASK1, AtCUL1 y 4-PADI, proteínas involucradas en la vía de degradación ubiquitina-proteosoma 26S. Ya que dichas proteínas se encuentran principalmente en el núcleo y citoplasma, se considera que algunas de las subunidades que conforman al heterotrímero SnRK1 también pueden hallarse en el núcleo, o bien en el citoplasma para posteriormente ser transportadas hacia la región nuclear [61].

Se ha formulado como hipótesis, que el complejo SnRK1 participa en la regulación de proteínas relacionadas con los procesos de ubiquitinilación y señalización de proteínas para su degradación vía proteosoma 26S. Sin embargo, se considera factible también que la degradación de la subunidad AKIN γ observada en los ensayos de *Western blot* y la degradación de la subunidad

AKIN11 en condiciones de privación de fósforo, pueda deberse a que durante la deficiencia nutrimental este complejo participa en procesos importantes de regulación metabólica [36]. La sutileza del mecanismo de regulación puede implicar la degradación de aquellas subunidades que no participen en la formación del heterotrímero bajo las condiciones enunciadas. A nivel fisiológico, lo anterior podría interpretarse como que a diferentes condiciones energéticas y nutrimentales en plantas, se favorece que una isoforma o subunidad dada, interactúe de manera específica con otras, dando diferentes combinaciones para la formación de complejos diversos e igualmente específicos [62], [63]. En cualquier caso, los resultados aquí presentados, también pueden deberse a la degradación ocurrida durante la manipulación de la muestra, por lo que la degradación *in vivo* requiere de confirmación mediante otras estrategias.

Inmunolocalización en tejidos de *A. thaliana*

La determinación de la localización de la proteína AKIN γ en cortes de tejidos aéreos y raíces de plantas *A. thaliana* desarrolladas en suficiencia de fósforo se efectuó mediante ensayos de inmunocitoquímica, utilizando el anticuerpo específico contra la proteína y un segundo anticuerpo acoplado al colorante fluorescente Alexa⁴⁸⁸. A continuación, se muestran los resultados obtenidos al analizar por microscopía confocal cortes transversales de hoja, silicuas y raíces y un corte longitudinal de flores.

En hojas, tal como se muestra en la Fig.23, la señal correspondiente al fluoróforo acoplado al segundo anticuerpo (rojo) se superpone con las señales relativas a la clorofila (verde), que emite de manera natural a 690 y 730 nm y se localiza al interior de los cloroplastos. Lo anterior implica que la subunidad reguladora AKIN γ presenta una localización cloroplástica.

Sin embargo, es pertinente comentar que al disminuir la luminosidad de la imagen, es posible observar señales puntuales e igualmente intensas que indican también la presencia de la proteína en el citoplasma. Si bien la proteína AKIN γ no se encuentra únicamente en la región cloroplástica (observada en naranja en la imagen traslapada), las señales citoplásmicas no corresponden a interacciones inespecíficas por parte del segundo anticuerpo, ya que el control negativo, con el suero preinmune, no dio ninguna señal (Fig. 24).

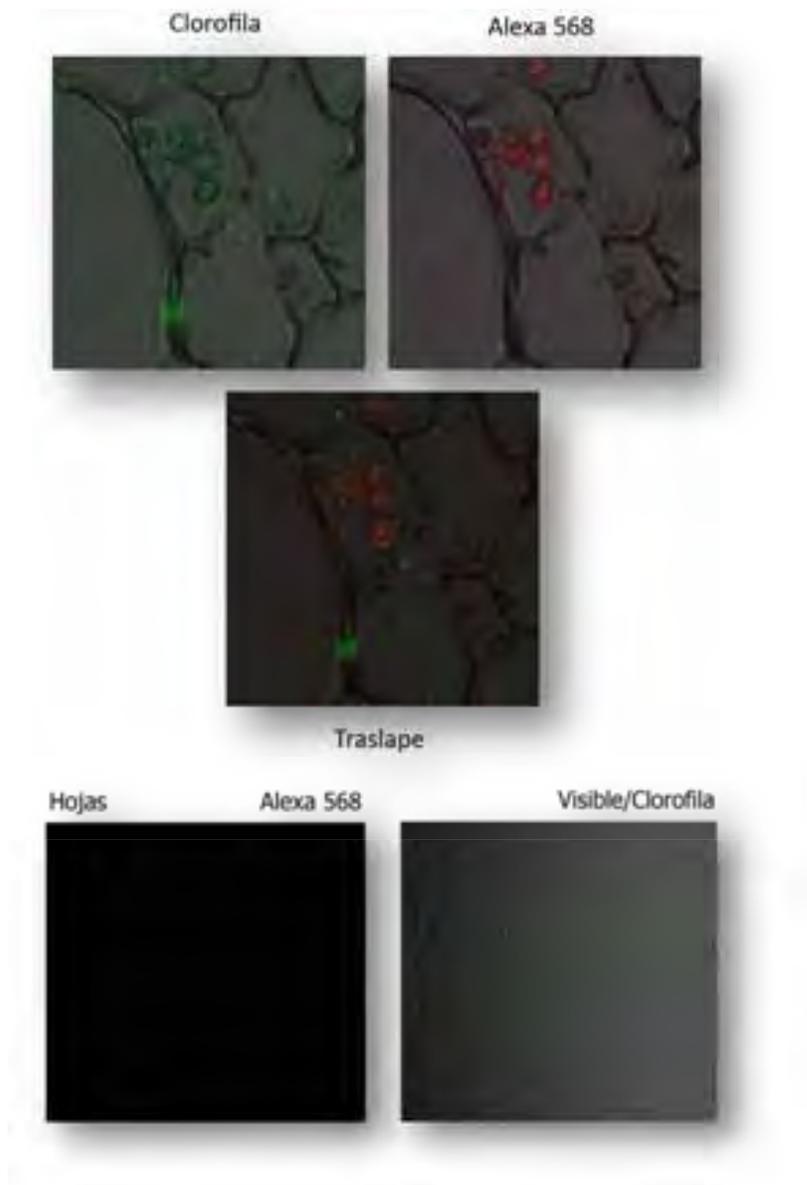


Fig.23. Imágenes generadas mediante microscopia confocal (Aumento 60X / Zoom 5x) de un corte de hojas. En verde se observa la emisión intrínseca de la clorofila, en tanto que rojo se aprecia la señal del fluoróforo Alexa⁵⁶⁸, que da cuenta de la presencia de AKIN γ . En el traslape se muestran señales sobrepuestas de la clorofila, el colorante fluorescente y el canal visible. Abajo se muestran los controles preinmunes en el canal del Alexa⁵⁶⁸ y el traslape del visible y el canal de la clorofila, no se observan señales que denoten la presencia de la proteína.



Fig. 24. Imágenes generadas mediante microscopía confocal. Se observa un acercamiento sobre un corte de hojas, nuevamente es posible observar que la proteína se encuentra en la superficie de los cloroplastos, así como en regiones del citoplasma.

Las subunidades catalíticas AKIN10 y AKIN11 y la subunidad $\beta\gamma$ presentan una localización cloroplástica, siendo que únicamente la última exhibe en su secuencia un péptido señal característico en proteínas localizadas en dichos plastidios. Aunado a lo anterior, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que dichas subunidades se encuentran asociadas a la superficie de los gránulos de almidón [36]. El resultado obtenido permite especular que las tres subunidades que podrían estar formando parte del complejo efectivamente se encuentran en el cloroplasto. También, resulta novedoso que AKIN γ también se encuentre en el citoplasma de las células que conforman al tejido fotosintético en hojas. Resultados obtenidos en el laboratorio indican que las subunidades AKIN $\beta\gamma$ y AKIN γ pueden interactuar e inmunoprecipitar conjuntamente; dado que AKIN γ no tiene un péptido señal intrínseco, actualmente se está evaluando la posibilidad de que sea la subunidad $\beta\gamma$ la que internalice a γ y las subunidades catalíticas al cloroplasto, para ensamblar un complejo activo.

En flores, las señales relativas al segundo anticuerpo acoplado con Alexa⁵⁶⁸ se observan en el centro del gineceo, circundado por el carpelo en un corte longitudinal del tejido (Fig.25). En angiospermas el gineceo consta de uno o más carpelos que dan paso a la cavidad en donde se localiza el ovario, observado a la derecha en la figura mostrada, en la que se presentan acercamientos secuenciales del gineceo o pistilo. Nuevamente, la intensidad de la señal del fluoróforo (rojo) fue reducida para disminuir al máximo las señales inespecíficas.

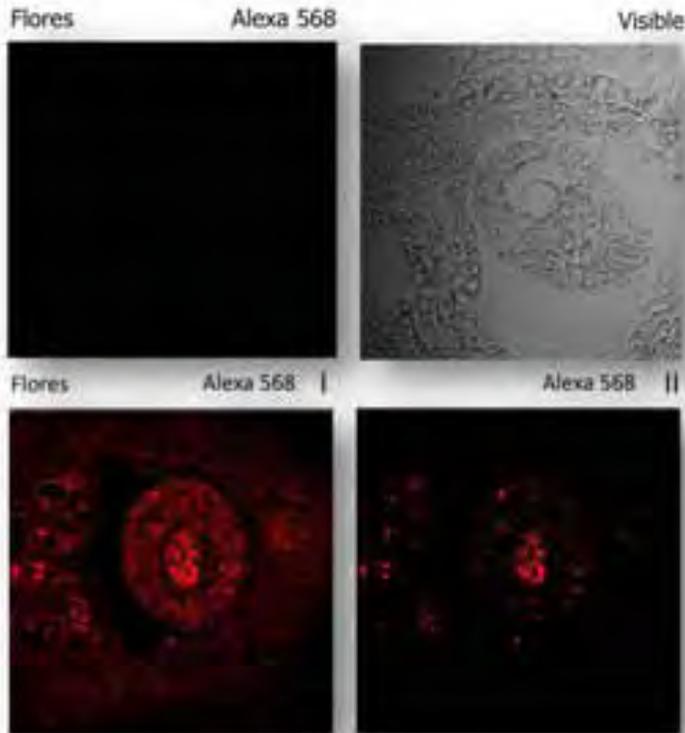


Fig. 25. Imágenes generadas mediante microscopía confocal. Se observa un corte longitudinal de flores (I). En la imagen de la derecha (II) se muestra el mismo corte, pero con una disminución de la intensidad de luz incidente, para determinar si algunas señales observadas dan cuenta de inespecificidad por parte del segundo anticuerpo. Además, se presentan los controles preinmunes pertinentes.

En el caso de las silicuas o vainas, se presenta un corte longitudinal de semillas en desarrollo con el tejido que lo rodea. La proteína se expresa en gran cantidad en las semillas, tal como se muestra en la Fig. 26 y su localización aparentemente es citoplásmica. Nuevamente, en el control negativo con suero preinmune, no se observan señales.

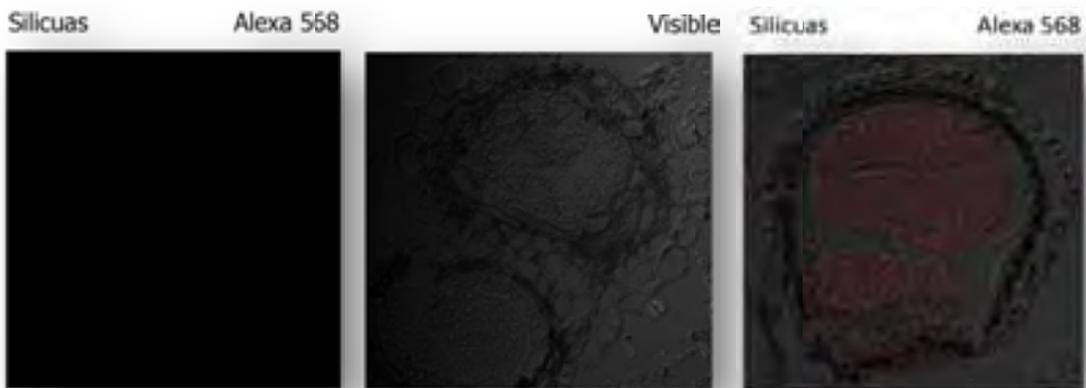


Fig. 26. Microscopía confocal de un corte transversal de silicuas. Se muestran los controles negativos y las señales del anticuerpo contra AKINγ.

El hecho de que la proteína AKIN γ se presente en gran cantidad en los tejidos reproductivos de la planta, en regiones cercanas al óvulo y, posteriormente, en las semillas, permite cuestionarse acerca de su función en dichos tejidos durante las distintas etapas de desarrollo. Se tiene evidencia de que el complejo SnRK1 participa en la regulación del metabolismo de carbohidratos en diversas etapas del desarrollo de la planta, incluyendo la fecundación de los óvulos y la maduración de las semillas, hasta el proceso de germinación [28], la localización y distribución reportada en éste trabajo es consistente con el papel fisiológico mencionado. Datos obtenidos en la literatura revelan que plántulas de chícharo (*Pisum sativum*) con una expresión disminuida de SnRK1 desarrollan un fenotipo similar al observado en ausencia de ácido absísico en semillas; lo anterior es indicativo de la importancia del complejo heterotrimérico durante dicho estado de desarrollo [64].

En raíces AKIN γ se aprecia alrededor de los haces vasculares, no dispuesta alrededor del xilema, sino en células del floema. Datos obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio, indican que las subunidades catalíticas AKIN10 y AKIN11, se encuentran presentes en todos los tejidos de la raíz; sin embargo, durante deficiencia nutrimental por fósforo dichas proteínas se localizan solamente alrededor de los haces vasculares. Ya se ha demostrado que en deficiencia nutrimental, la subunidad reguladora AKIN11 se degrada, por lo que se sugiere que bajo dichas condiciones, únicamente permanece íntegra la subunidad AKIN10 [36]. Los datos obtenidos en este trabajo

sugieren que la subunidad AKIN γ , al colocalizar con la subunidad AKIN10 podría estar formando parte del complejo heterotrimérico. Esto podría comprobarse mediante el aislamiento de los complejos y la identificación de las subunidades que lo componen.

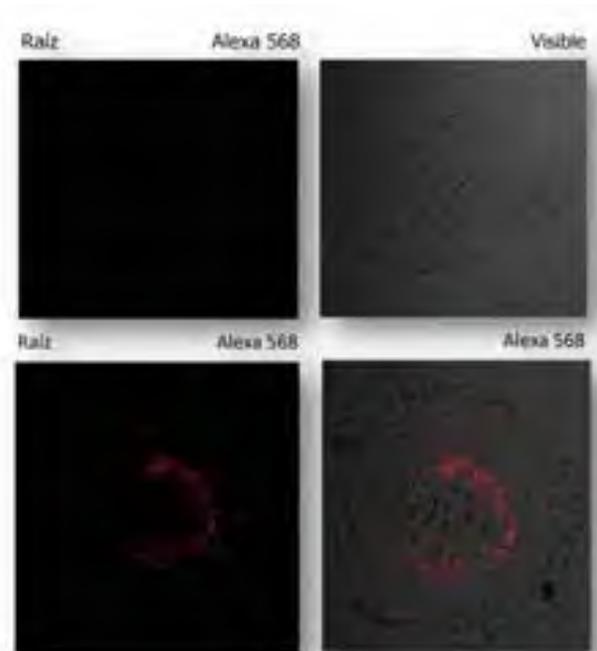


Fig. 27. Microscopía confocal de un corte transversal de raíz, AKIN γ se localiza en la región del xilema. En el control negativo no se observan señales.

Dado que no se llevaron a cabo ensayos de inmunocitoquímica en cortes de tejido de plantas desarrolladas en privación de fósforo, no es posible efectuar la comparación pertinente con las observaciones realizadas sobre la localización de AKIN γ . Sin embargo, se puede abundar en la discusión sobre la localización subcelular al afirmar que la subunidad AKIN γ colocaliza con las subunidades catalíticas AKIN10 y AKIN11 en el citoplasma y en el cloroplasto.

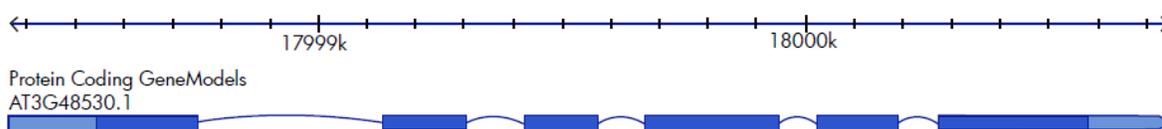
Resulta interesante comentar que las señales relativas a AKIN γ que indican la presencia de la proteína en el citoplasma son consistentes con los resultados obtenidos por el grupo de trabajo de la Dra. Coello Coutiño [36]; la presencia de las subunidades catalíticas y la subunidad reguladora γ en la región citoplasmática puede relacionarse incluso con datos que afirman que el complejo SnRK1 está implicado directamente en la regulación e inactivación de enzimas como la nitrato reductasa (NR), sacarosa fosfato sintasa (SPS) y HMG-CoA reductasa [65], [2]. La localización cloroplástica de AKIN γ probablemente también pueda deberse a que ésta, al interactuar con las subunidades que conforman al complejo, sea transportada hacia dicho organelo; debe recordarse que la subunidad $\beta\gamma$ presenta una secuencia de localización cloroplástica, de acuerdo a los análisis efectuados por [66], y que son referenciados en el artículo publicado por nuestro grupo de trabajo.

También se estableció, mediante el análisis de secuencias efectuado por Horton (2007) y su grupo de trabajo, que las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$, están presentes principalmente en el núcleo y el citoplasma. Se considera que la presencia de secuencias de localización cloroplástica en las subunidades reguladoras β y $\beta\gamma$ determinan, mediante su interacción con las subunidades catalíticas, la localización del heterotrimerio en diferentes organelos, dependiendo del tipo de subunidad o isoforma involucrada en la formación del complejo y, en este caso, se pueden hacer afirmaciones similares con respecto a las subunidad AKIN γ . La relevancia a nivel fisiológico de encontrar a las subunidades catalíticas, la subunidad $\beta\gamma$ y la subunidad AKIN γ_1 en cloroplastos no ha sido elucidada, sin embargo, es probable que pueda deberse a la participación del complejo en el metabolismo de almidón [36].

Sobreexpresión de AKIN γ en *Escherichia coli*

El gen AT3G48530 codifica a la subunidad reguladora AKIN γ_1 del complejo SnRK1 en *Arabidopsis thaliana*. Para obtener la proteína recombinante AKIN γ se empleó una secuencia de 1275 pb relativa al CDS obtenido en el Arabidopsis Biological Resource Center ABRC.

A continuación se muestra un modelo de las regiones codificantes, en el cual se puede apreciar la estructura del gen.



5'-utr	Exon	Intron	Exon	Intron	Exon	Intron
1 181	1-386	387-768	769-941	942-1059	1060-1215	1216-1308
Exon	Intron	Exon	Intron	Exon	3'-utr	
1309-1584	1585-1662	1663-1826	1827-1914	1915-2386	2216-2386	

182 – 386	769 – 941	1060-1215	1309-1584	1663-1826	1915-2215	Regiones codificantes
------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	------------------	----------------------------------

El vector pENTR/SD/D-TOPO (2601 pb) con el cDNA de AKIN γ se purificó eficientemente con el Kit Pure Link Quick Plasmid Miniprep®. Una vez verificada la identidad del inserto mediante secuenciación, se procedió con la amplificación mediante PCR. El cDNA obtenido en la amplificación se ligó al vector de expresión pEt101/D-TOPO. Después de la reacción de ligación, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* ONE SHOT TOP 10 BL21 con el plásmido.

La selección primaria de las mismas se llevó a cabo por medio de la expresión de un gen de resistencia a ampicilina, sin embargo para comprobar la presencia del gen AT3G48530 se efectuó una digestión doble con las endonucleasas de restricción XbaI y HindIII. La reacción con la doble digestión se monitoreó mediante electroforesis en agarosa, y la imagen se registró con el equipo Fluor-S® [Biorad] en modo de detección para bromuro de etidio. En las muestras de la digestión se pueden observar dos fragmentos en aproximadamente 5.7 kb y 1.2 kb; el fragmento de menor tamaño da cuenta de la liberación del inserto del gen de interés del plásmido pEt101-D. Para demostrar efectivamente la presencia del gen que codifica a la proteína AKIN γ en el vector, se realizó un ensayo de PCR y se determinó que únicamente dos colonias 1-pEt101D- γ y 2-pEt101D- γ

habían expresado el plásmido con el inserto de la subunidad reguladora (Fig.29).

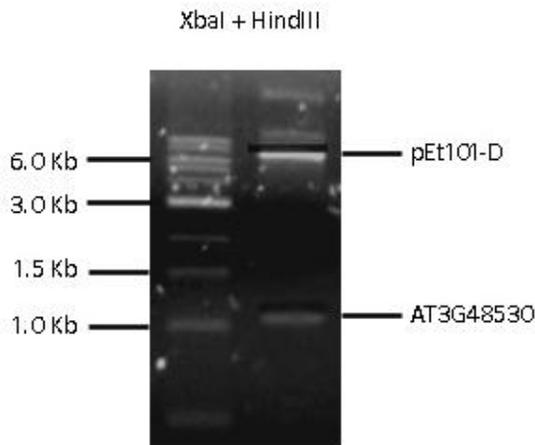


Fig. 28. Gel de electroforesis en agarosa, teñido con bromuro de etidio. El plásmido pEt101-D se sometió a una digestión doble con las enzimas de restricción XbaI y HindIII. La banda débil observada a aproximadamente 1.2 kb corresponde al gen AT3G48530 que codifica a la subunidad AKIN γ mientras que la banda de mayor intensidad, a prácticamente 6.0 kb, da cuenta del vector pEt101D.

El ensayo de PCR mostró que efectivamente existía amplificación de un segmento de cDNA, por lo que fue posible proceder con la sobreexpresión y posterior purificación de la proteína.

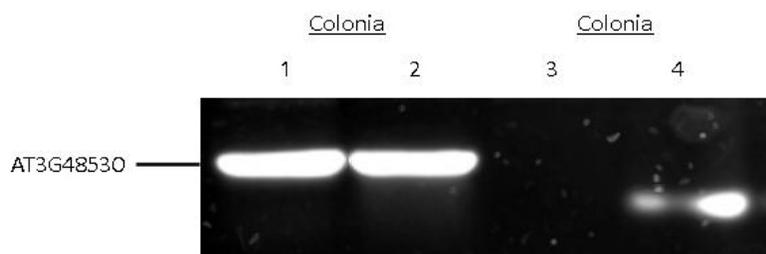


Fig. 29. Gel de electroforesis en agarosa con bromuro de etidio de los productos de PCR, tal como se observa, únicamente existe amplificación del gen que codifica a AKIN γ en las colonias 1-pEt101D- γ y 2-pEt101D- γ . El fragmento se observa a 1.2 kb.

Inducción de la expresión de la AKIN γ con IPTG

Al analizar el resultado de la inducción a 37 °C con IPTG 0.5 mM por 3 h, mediante la técnica de Western blot, se estableció que la proteína AKIN γ fue expresada, de tal manera que resulta posible observar su presencia tanto en la membrana de polivinilidenofluoruro (ligeramente por debajo del nivel del marcador de peso molecular de 50 kDa) como en la placa fotosensible, determinándose que la subunidad reguladora pesa aproximadamente 48 kDa (Fig.30).

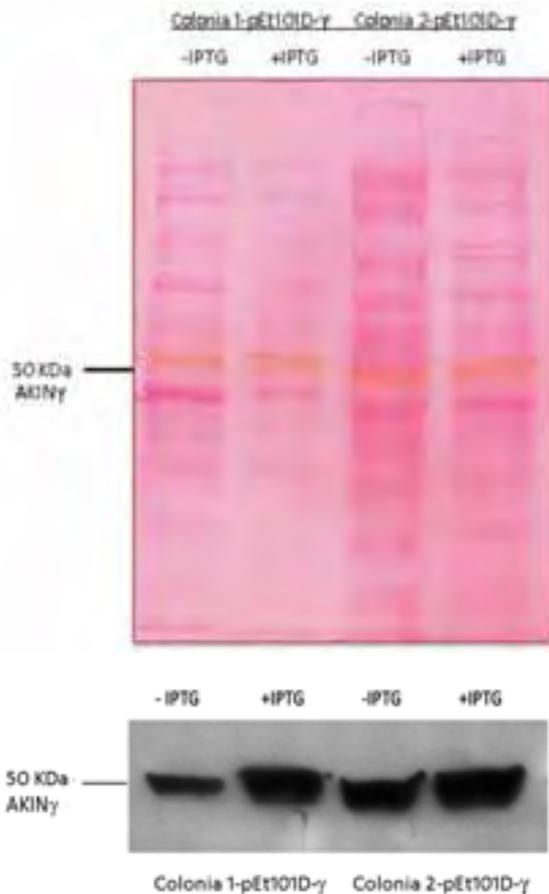


Fig. 30. Membrana teñida con rojo de Ponceau, relativa a la inducción de la sobreexpresión de AKIN γ con IPTG 0.5 mM por 3 h en las colonias 1-pEt101D- γ y 2-pEt101D- γ de cepas de *E. coli* BL21. AKIN γ se observa ligeramente por debajo del marcador de peso de 50 kDa.

Fig. 31. Western blot relativo a la inducción de la sobreexpresión de AKIN γ con IPTG 0.5 mM por 3 h en las colonias 1-pEt101D- γ y 2-pEt101D- γ de cepas de *E. coli* BL21. La película fotosensible se expuso durante 1 min. La inducción no muestra una expresión de AKIN γ sustancialmente mayor.

En la placa fotosensible, mostrada en la Fig.31, se observa la proteína de manera selectiva, sin bandas inespecíficas o que indiquen degradación. Se debe hacer notar que no fue posible obtener una mayor cantidad de la proteína en los carriles relativos a las muestras inducidas (+IPTG) con respecto a los carriles control (-IPTG).

Purificación de AKIN γ con Ni-NTA

Con el objetivo de purificar la proteína AKIN γ se llevaron a cabo diversas estrategias de purificación mediante cromatografía de afinidad empleando una resina comercial de Ni-NTA[®], debido a que la proteína recombinante presenta hacia el extremo C-terminal una secuencia de seis His. Las histidinas presentes en la proteína expresada son capaces de interactuar mediante enlaces coordinados con el catión metálico en complejo con ácido nitrilotriacético NTA, dando paso a compuestos coordinados. El NTA es un agente quelatante tetradentado que ocupa cuatro posiciones de coordinación en el metal, por lo que este se halla enlazado a una matriz de agarosa. Inicialmente, se efectuó un ensayo de purificación en *lote*, a partir de un cultivo de 50 mL utilizando 250 μ L de la suspensión de níquel-nitrilotriacético; dado que no se observaron impurezas en las fracciones de elución de AKIN γ se decidió escalar el experimento empleando un cultivo de mayor volumen.

Tal como se describió en el apartado Materiales y Métodos, se inocularon 2 L de medio LB con una muestra de la colonia 1-pEt101D- γ y se colocaron a incubar a 37 °C en agitación constante hasta alcanzar una transmitancia óptica de 0.800 aproximadamente, a la cual se esperaba tener una cuenta óptima de microorganismos. Se adicionó 1 mL de IPTG 0.5 mM para favorecer la sobreexpresión de la subunidad reguladora AKIN γ durante un periodo preferente de 3 h, evitando la degradación de la proteína por acción de proteinasas. El contenido del matraz se centrifugó a 7 996 g durante 10 min para formar pastillas celulares, que se colocaron a -70 °C durante un periodo no mayor a 24 h.

En el caso de la purificación en *lote*, las pastillas celulares fueron resuspendidas en amortiguador de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM y NaCl 300 mM, además de 10 mM de imidazol e inhibidores de proteasas para evitar la degradación de la proteína una vez lisadas las células bacterianas. La suspensión de Ni-NTA se adicionó al sobrenadante obtenido tras la centrifugación y filtración con una membrana de 0.45 μ m, para permitir la formación cinética de complejos durante 1 h. Tal como se observa en los resultados presentados a continuación (Fig. 32). en las fracciones de elución E1 a E3, si bien es posible observar una cantidad considerable de la proteína AKIN γ (situada por debajo del marcador de peso molecular de 50 kDa), también, se observan tres

bandas de mayor peso molecular en todas las fracciones en las cuales eluyó la proteína de interés. Tras efectuar el mismo ensayo disminuyendo la fuerza iónica de los amortiguadores empleados a aquella impuesta por una concentración de 150 mM de NaCl, no se observaron cambios evidentes en el resultado de la purificación entre ambos ensayos experimentales.

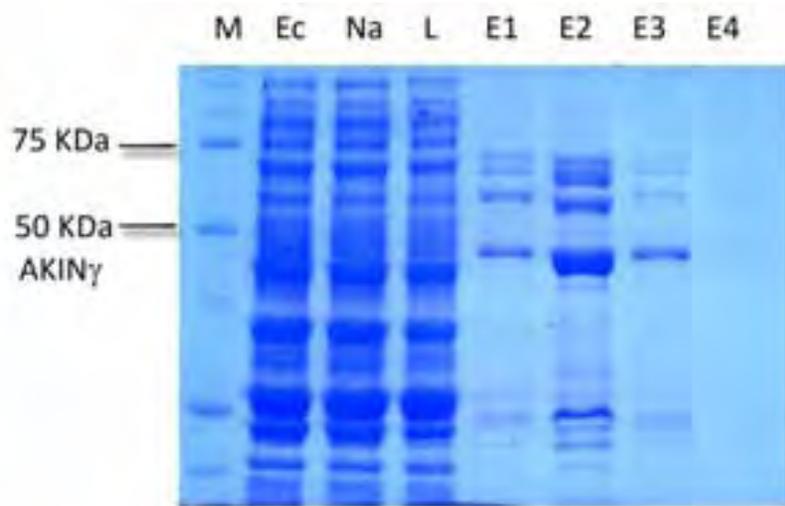


Fig. 32. Gel de electroforesis SDS-PAGE no reductora, teñido con azul de Coomassie. Purificación de AKIN γ con Ni-NTA, empleando para su elución amortiguador de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM, imidazol 250 mM y NaCl 150 mM. En las fracciones de elución E1, E2 y E3 es posible observar a la subunidad reguladora por debajo del marcador de 50 kDa acompañada por diversas impurezas.

Dado que no fue posible purificar eficientemente la proteína con la metodología descrita en el manual del producto de QIAGEN®, se optó por llevar a cabo una purificación mediante la técnica de cromatografía líquida rápida FPLC (Fig. 33). La suspensión comercial Ni-NTA® se equilibró con una disolución de imidazol 100 mM en amortiguador $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM y NaCl 300 mM. El sobrenadante se adicionó directamente a la columna empacada con Ni (II) omitiendo la incubación por un periodo de 1 h efectuado en la metodología descrita anteriormente. La resina se lavó con la misma disolución y la proteína unida se eluyó con un gradiente de 100 - 300 mM de imidazol en el mismo amortiguador. Se recuperaron 20 fracciones de 0.5 mL.

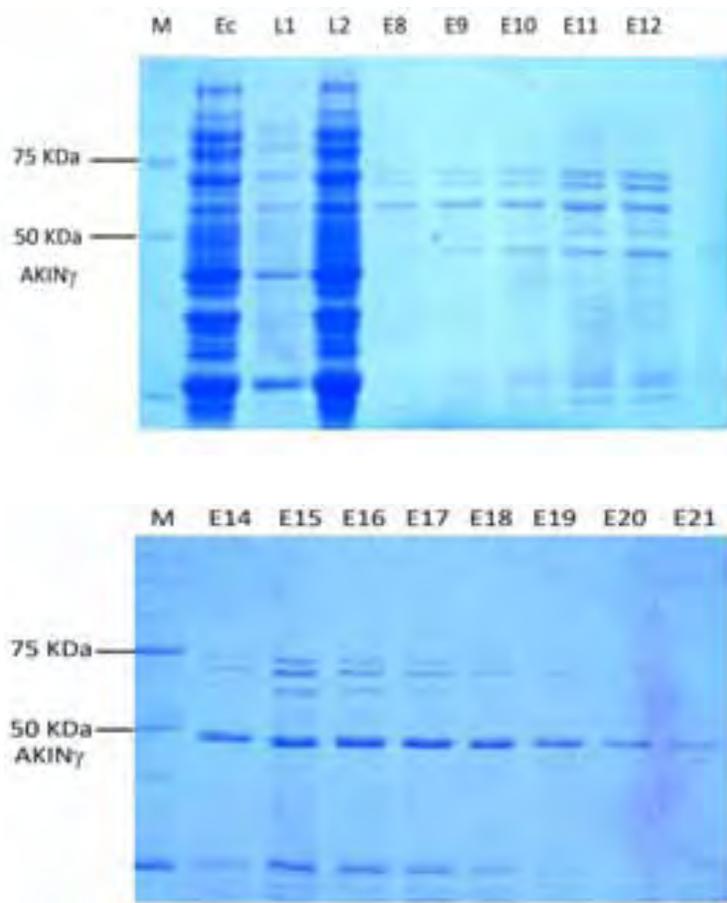


Fig. 33. Gel de electroforesis SDS-PAGE no reductora, teñido con azul de Coomassie. Purificación de AKIN γ con Ni-NTA mediante la técnica de FPLC. Se presentan los carriles relativos al extracto crudo empleado como referencia, los lavados a 50 y 100 mM de imidazol y las fracciones recuperadas durante la elución.

La proteína AKIN γ se observa mayoritariamente en las fracciones E14 a E21, sin embargo únicamente a partir de la fracción E17 se encuentra relativamente pura.

Si bien la purificación mediante FPLC permitió obtener fracciones enriquecidas en la proteína AKIN γ con una pureza mayor al 85 %, no se puede afirmar que la técnica haya permitido eliminar eficientemente las impurezas. No obstante, las fracciones denominadas E18, E19, E20 y E21 se recuperaron para posteriormente eliminar el imidazol por medio de lavados sucesivos en Amicon de 30 kDa. La integridad de la proteína en las muestras concentradas se verificó mediante un ensayo de Western blot.

La última estrategia de purificación se implementó debido a que ya no fue posible repetir el ensayo de purificación mediante FPLC. Se utilizaron únicamente 1.5 mL de la suspensión comercial Ni-NTA[®] y se adicionaron en una columna de 10 mL previamente empacada con SiO₂; en este caso se equilibró con 10 mL de amortiguador de pH 7.8 y NaCl 150 mM, adicionado con imidazol 10 mM, considerando que al disminuir la concentración de imidazol al cual se equilibró la resina se favorecería la elución a menor concentración de la sal orgánica. Se montó un sistema de purificación que constaba de un generador de gradientes y una bomba peristáltica, para emular

las condiciones de purificación establecidas en la estrategia anterior. Los lavados se realizaron con concentraciones de la sal orgánica menores a 50 mM y la proteína AKIN γ eluyó aproximadamente a 200 mM de imidazol. Se recuperaron 10 fracciones de elución.

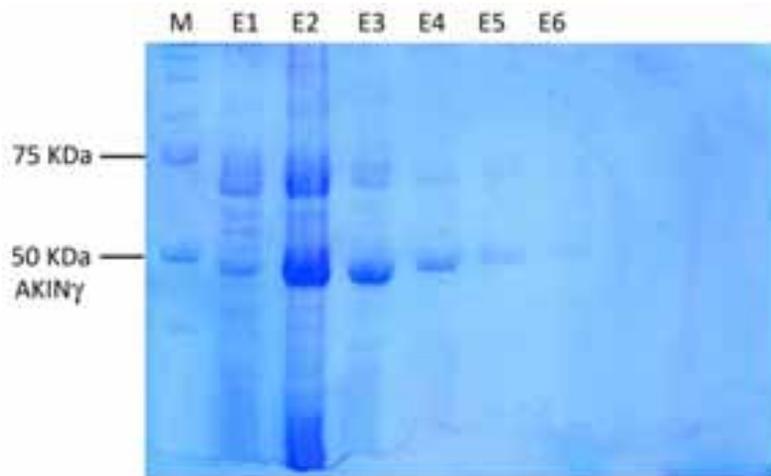


Fig.34. Gel de electroforesis SDS-PAGE no reductor, teñido con azul de Coomassie. Purificación de AKIN γ con Ni-NTA mediante la técnica alternativa implementada con un formador de gradientes. Se presentan los carriles relativos a las fracciones de elución recuperadas E1 a E6.

Efectivamente, tal como se muestra en los resultados de la Fig.34, lograron obtenerse al menos dos fracciones enriquecidas en la proteína AKIN γ de una pureza aceptable y en las cuales las impurezas de mayor peso molecular resultan minoritarias. Tras concentrar y lavar ambas muestras, se determinó por espectroscopia UV/Vis, una concentración final de 500 μg /mL. Finalmente, fue posible obtener dos fracciones libres de las proteínas localizadas a aproximadamente 70 kDa. La eliminación eficaz de las impurezas no fue posible con las estrategias puestas en práctica, debido a que se requiere de un segundo paso de purificación, quizás mediante cromatografía de intercambio iónico. La presencia de seis residuos de (R)-2-amino-3-(4-imidazolil) ácido propiónico en el extremo carboxilo de la proteína AKIN γ expresada permite la formación de un complejo octaédrico de Ni (II), en el cual interactúan con el catión dos residuos de His, por medio del N1 del anillo. Se debe considerar que las impurezas, al parecer, también interactúan con el metal dando paso a complejos de estabilidad similar al formado entre la proteína recombinante y el Ni, por lo que efectuar una purificación basada en la separación de proteínas con cargas superficiales distintas, bajo un pH impuesto, probablemente resultaría eficiente.

Fluorimetría: Ensayos de titulación de AKIN γ con AMP

Mediante espectroscopia de fluorescencia se efectuó un estudio sencillo de titulación de la subunidad AKIN γ con adenosin 5'-monofosfato AMP, con el objetivo de determinar si la proteína interactúa con nucleótidos al igual que sus homólogas SNF4 y AMPK γ_1 . Los ensayos realizados deben ser considerados como una primera aproximación a los estudios de unión de ligandos a la subunidad reguladora AKIN γ .

Por medio del análisis de los resultados únicamente fue posible asociar los cambios en la fluorescencia intrínseca (*IF*) observados con la inducción de cambios conformacionales en la subunidad, como consecuencia probable de la unión de AMP. A reserva de un estudio detallado, en el cual el cambio máximo de fluorescencia pueda ser considerado como una fuente de información indicativa de los parámetros cinéticos, se efectuó un cálculo tentativo mediante regresión no lineal empleando un tratamiento estadístico que permitió obtener una medida indirecta de la afinidad media de la proteína por el nucleótido, a través del valor de L_{50} (concentración de ligando que produce el 50 % del apagamiento máximo posible en la *IF* de la proteína por la adición del mismo), factor contenido en la ecuación [1].

En las determinaciones con el espectrofluorómetro Shimadzu, se emplearon tres muestras diferentes de proteína en presencia de glicerol, para mantener la estabilidad de la proteína durante la purificación y almacenamiento. Los controles respectivos para cada uno de los ensayos sobre el efecto del filtro interno también se efectuaron en presencia de glicerol. Por limitaciones propias del equipo empleado, los datos fueron recuperados mediante la digitalización de los espectros impresos. Tras llevar a cabo la corrección sobre los datos de *IF* al considerar el efecto de dilución de la proteína, se estableció que dado que el volumen de las adiciones de AMP durante la titulación fue mínimo (menor a 4 μ L), no se presentaron variaciones importantes en la intensidad de fluorescencia intrínseca ocasionadas por el efecto del filtro interno. De igual forma, al considerar los valores de absorbancia del nucleótido monofosfatado a 295 y 320 nm, tampoco se observaron desviaciones de la tendencia apreciada inicialmente. Ya que se estableció que la unión del nucleótido monofosfatado produce cambios en la fluorescencia intrínseca *IF* de los

residuos de triptófano de la proteína y que difícilmente pueden aducirse al efecto de dilución de la misma, no fue necesario emplear fluoróforos externos.

Como un ejemplo de los resultados obtenidos en los ensayos de fluorimetría, se presentan los espectros de emisión de los residuos de Trp a 320 nm al titular la proteína AKIN γ purificada con AMP (Fig.35). Se puede observar un apagamiento de la intensidad de fluorescencia al tiempo en que se incrementa la concentración del nucleótido, excepto en los dos espectros finales (prácticamente 100 y 150 μ M de AMP). En ningún caso pueden apreciarse corrimientos significativos en la longitud de onda de emisión máxima.

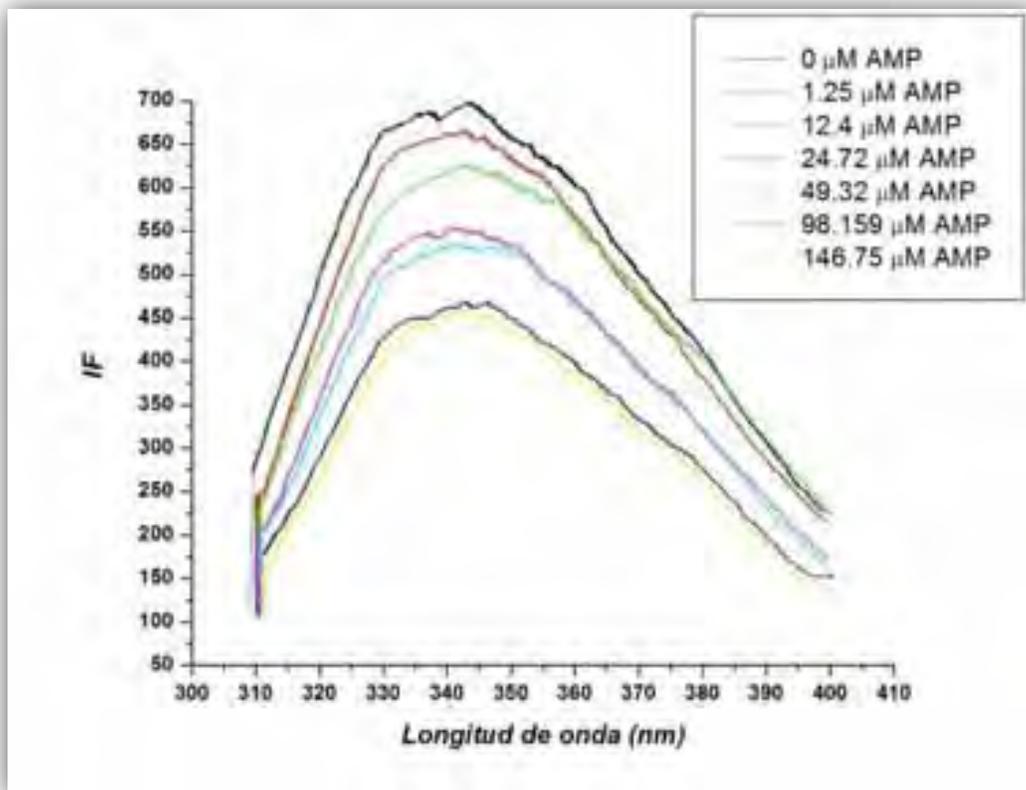


Fig.35. Espectros de fluorimetría obtenidos en el espectrofluorómetro Shimadzu. Las curvas corresponden a la titulación de la proteína con AMP de 125 μ L de una muestra de AKIN γ de concentración 0.2500 mgmL $^{-1}$ en 275 μ L de amortiguador de KH $_2$ PO $_4$ /K $_2$ HPO $_4$ 50 mM y NaCl 150 mM.

Las variaciones observadas en la *IF* son indicativas de los cambios conformacionales en la proteína, probablemente ocasionados por la unión del nucleótido en los sitios disponibles.

Considerando que la subunidad AKIN γ pudiera estar interactuando con el nucleótido adicionado, así mismo, la disminución en la intensidad de fluorescencia máxima puede interpretarse como una consecuencia del cambio conformacional inducido y que promueve el reacomodo y aproximación de algunos residuos de Trp responsables de la fluorescencia intrínseca de la proteína. Al hallarse próximos los residuos aromáticos, se favorecerían fenómenos de transferencia de carga o *quenching* entre los mismos, propiciando un apagamiento en la *IF* observada inicialmente. Se debe recordar que la subunidad reguladora AKIN γ posee 9 residuos de tirosina (Y), 19 residuos de fenilalanina (F) y únicamente 6 residuos de triptófano (W).

Tal como se observa en la Fig.35, la tendencia inicialmente observada (disminución de la *IF* hasta la adición de aproximadamente 50 μ M de AMP), probablemente sea representativa de la ocupación de un sitio (presente en alguno de los motivos CBS característicos de la subunidad) por un equivalente de AMP. Es probable que el aumento en la *IF* apreciado, en el caso de las dos adiciones finales del nucleótido, dé cuenta de la unión de otro equivalente de AMP a la subunidad, mismo que induce un segundo cambio conformacional que aparentemente favorece en este caso, un aumento ligero en la *IF*. Concentraciones mayores a 150 μ M no indujeron cambios notorios en la intensidad de fluorescencia intrínseca de la proteína, por lo que se sospechó la saturación de la misma.

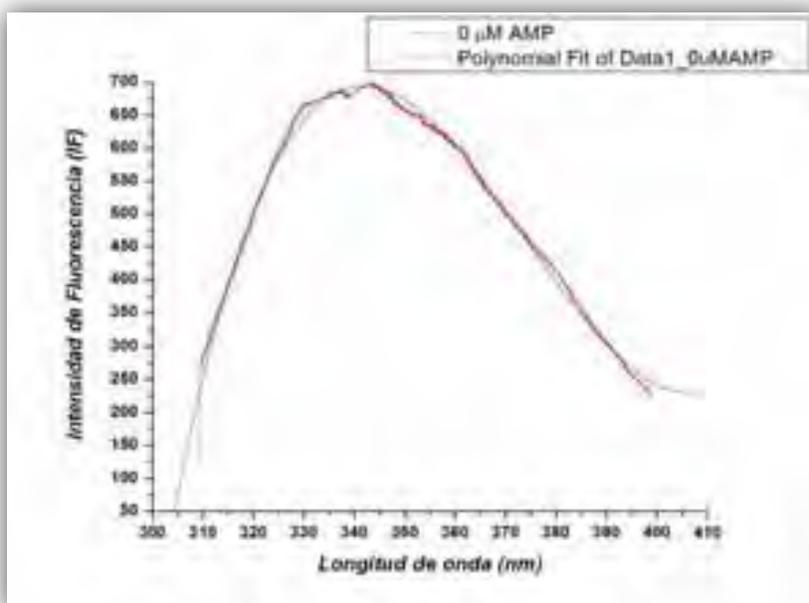


Fig. 36. Espectro de IF intrínseca de AKIN γ (0.125 μ L en 400 μ L) al adicionar 1 μ M de AMP, tras efectuar una corrección por el efecto de dilución de la proteína y por la absorbancia del AMP a dos longitudes de onda diferentes.

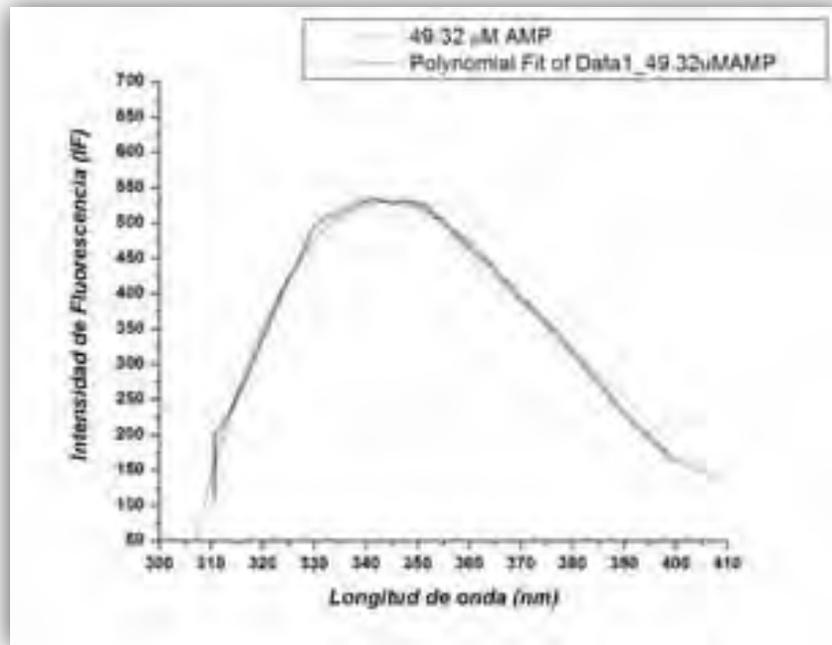


Fig. 37. Espectro relativo a la adición de prácticamente 50 μ M de AMP, corregido por el efecto de dilución de la proteína y por la absorbancia del AMP a dos longitudes de onda diferentes.

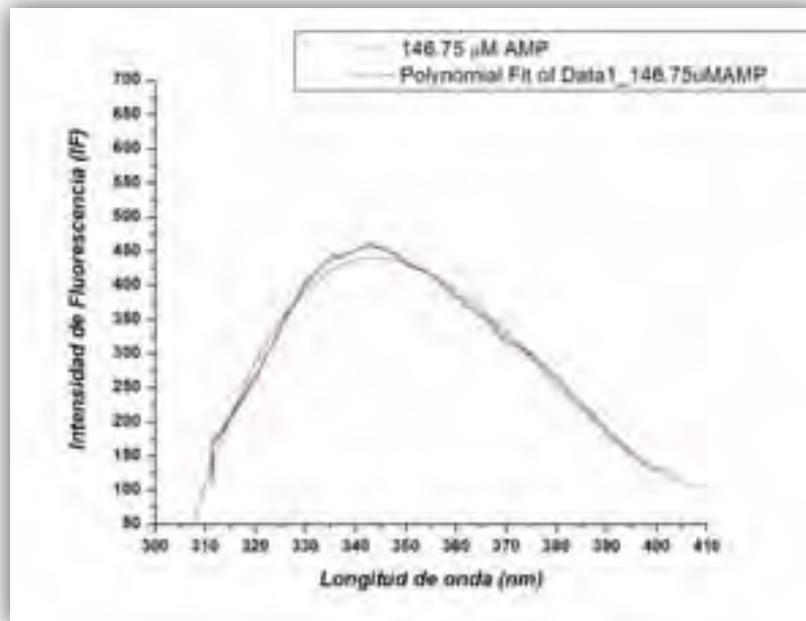


Fig. 38. Espectro correspondiente a la adición de aproximadamente 150 μ M de AMP. Valores superiores a dicha concentración se consideran saturantes, ya que no promovieron cambios importantes en la IF máxima observada.

Tal como se observa en las gráficas anteriores, existen comportamientos diferenciables que, en conjunto, tal vez podrían correlacionarse con la presencia de al menos dos tipos de sitios funcionales en la subunidad AKIN γ . Debe recordarse que durante la eliminación de imidazol no fue posible hacer óptima la relación entre absorbancias a A^{280}/A^{260} hasta lograrse un valor de 2.0; como se mencionó antes (pp. 35), la imposibilidad de disminuir el valor de la absorbancia a 260 nm puede deberse a que la proteína presentara desde su purificación a partir de los extractos celulares de *E.coli*, AMP ocluido en un sitio de unión. De encontrarse un nucleótido en la subunidad, debe comprobarse experimentalmente su presencia.

Para ilustrar gráficamente las variaciones observadas en la *IF* intrínseca de la proteína tras la adición del nucleótido, se graficó la $IF_{M\acute{a}x}$ Vs $[AMP]$ (μM). En la Fig.39 es posible observar los datos de tres ensayos distintos, las tendencias de apagamiento y posterior aumento en la fluorescencia se mantienen, siendo mayor la variación entre los puntos relativos a la última adición del nucleótido ($\approx 150 \mu M$).

Al aproximar los resultados experimentales a un comportamiento asintótico se obtuvo una afinidad media de 11.9 con una desviación estándar de ± 1.71 , a partir del valor de la concentración de AMP que generó la mitad del apagamiento máximo posible (L_{50}). La dispersión de los datos, se representa por barras de error.

Se debe comentar que, los valores anteriores pueden sugerir la existencia de más de un sitio de unión a nucleótidos con efectos no equivalentes sobre la respuesta en la fluorescencia de la proteína, por lo que cabría esperar que presentaran afinidades distintas por el AMP.

Dado que el valor de L_{50} da cuenta de la afinidad media de la proteína por el ligando y la unión del nucleótido monofosfatado se presenta en el rango de concentraciones μM , resulta probable que lo anterior tenga un significado fisiológico relevante. Sin embargo, la confirmación de dichas suposiciones requeriría de un análisis más profundo, que no se realizó por limitaciones de tiempo y planeación del experimento.

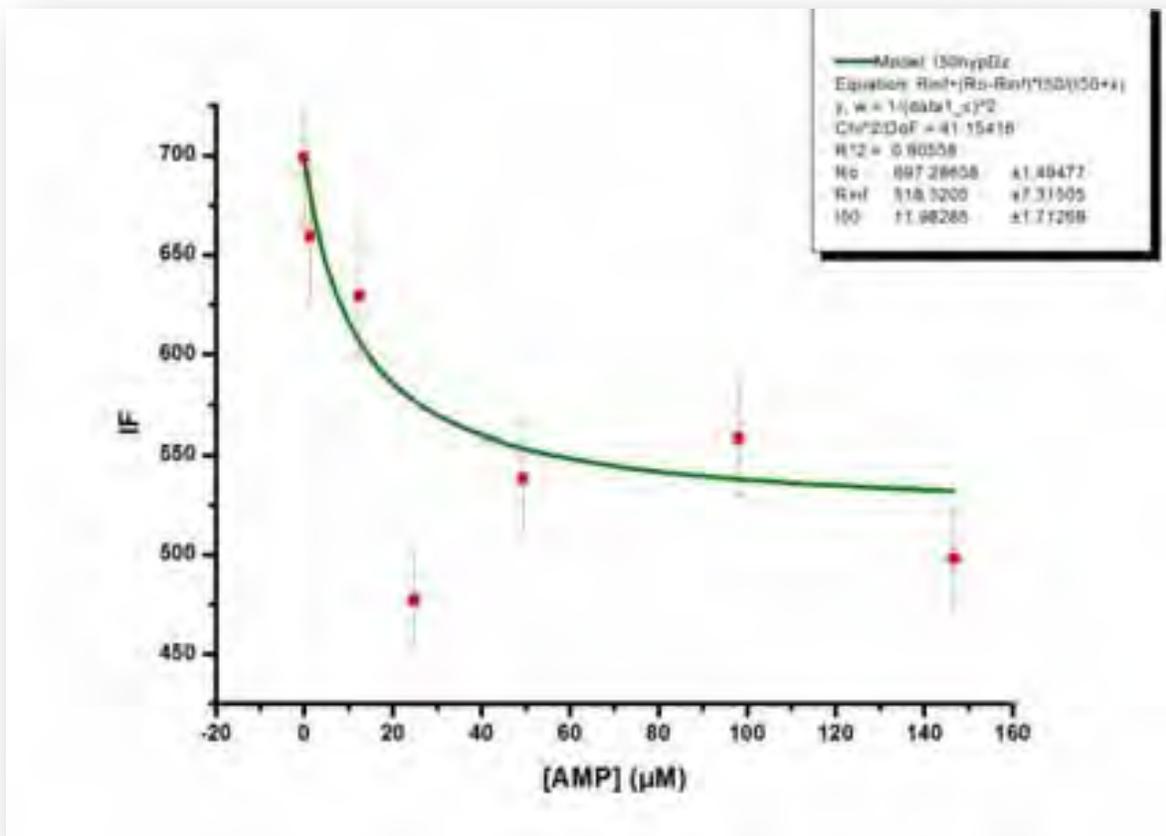


Fig. 39. Gráfico de la IF máxima Vs [AMP] (μM). Muestra una aproximación de los datos a una tendencia asintótica por medio de un tratamiento estadístico de regresión no lineal. Se obtuvieron valores numéricos de los factores $L_{50} = 11.98 \pm 1.713$ con un valor bajo para el factor de correlación R^2 de 0.90558, $F_0 = 697.29 \pm 1.495$ y $F_\infty = 518.52 \pm 7.315$. La mayor dispersión de datos se presentó al adicionar $25 \mu\text{M}$ y $150 \mu\text{M}$ del nucleótido.

Apéndice I: Modelado estructural y dinámica molecular MD de AKIN γ

La estructura tridimensional de la subunidad reguladora AKIN γ se modeló mediante HMMs (Hidden Markovian Models) por el servidor SAM-T08 (Sequence Alignment and Modeling Software System), a partir de la secuencia traducida del gen AT3G48530. El archivo de salida (AKINsm_hc_bo_a-O.pdb) generado por el servidor SAM-T08 [K. Karplus, A. Williams, R. Karchin, S. Tu, C. Barrett HMM-based Protein Structure Prediction, SAM-T08, http://compbio.soe.ucsc.edu/SAM_T08/T08-query.html] contiene información sobre las coordenadas y los estados intermedios de modelado, además de las predicciones de contactos dentro de la estructura tridimensional.

Con el objetivo de corregir las anomalías presentes en las distancias interatómicas y longitudes de enlace respetando la conectividad en la estructura tridimensional, pero restringiendo la movilidad para evitar cambios drásticos al patrón de plegamiento, el modelo de SAM-T08 se sometió a una minimización de la energía del sistema empleando la siguiente estrategia: i) Restringir el movimiento de las cadenas laterales de la proteína al tiempo en que se minimiza el backbone hasta converger el sistema en $0.10 \text{ Kcalmol}^{-1}\text{Å}^2$, o completar 100 ciclos de minimización, ii) Minimizar las cadenas laterales limitando el movimiento del esqueleto de la proteína hasta alcanzar el sistema $0.25 \text{ Kcalmol}^{-1}\text{Å}^2$, o completar 50 ciclos de minimización. El esquema se efectuó reiteradamente hasta alcanzar el gradiente esperado. Finalmente se realizó una minimización sin restricciones para afinar el ajuste de la geometría.

Se empleó el campo de fuerzas AMBER en Hyperchem Versión 7.5 [MakoLab (C) 1985-2007, Hypercube Inc.], debido a que permite importar estructuras en las que la geometría de algunos enlaces esté severamente distorsionada, sin introducir rupturas en la continuidad de la cadena polipeptídica. Posteriormente, se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular (MD). La dinámica molecular (MD) consiste en la predicción del movimiento de un átomo o grupo de átomos al someterlos a un potencial definido por un campo de fuerzas mediante la integración de ecuaciones de movimiento newtoniano. Para las simulaciones, se utilizan funciones diferenciables de las coordenadas atómicas que representan las energías clásicas en un sistema dado, ya que las

derivadas parciales de la función con respecto a las coordenadas atómicas cartesianas arrojan fuerzas que pueden ser empleadas para propagar el sistema a través del tiempo. En el contexto de la dinámica molecular, el término campo de fuerza se refiere a una combinación de funciones o ecuaciones diferenciales y parámetros utilizados para describir la energía de una sistema molecular como función de sus coordenadas atómicas [67].

La simulación se llevó a cabo por 5 ns empleando el paquete GROMACS Versión 4.0.3 [D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, A. R. van Buuren, E. Apol, P. J. Meulenhoff, D. P. Tieleman, A. L. T. M. Sijbers, K. A. Feenstra, R. van Drunen and H. J. C. Berendsen, Gromacs version 4.0, www.gromacs.org (2005)]. GROMACS es un conjunto de programas escritos para realizar simulaciones MD que resulta particularmente útil para sistemas macromoleculares y en especial, de proteínas. Las simulaciones se llevaron a cabo en una caja de geometría octaédrica con una distancia a la pared de 1.5 nm, utilizando como disolvente H₂O y una concentración fija de 0.1 M de NaCl a 303 K. El control de la temperatura y presión se estableció al emplear el termostato y baróstato de Berendsen acoplados. Para efectuar la integración de las ecuaciones de movimiento clásicas o newtonianas se empleó el algoritmo *leap-frog*, descrito como md en el archivo de configuración de GROMACS.

Inicialmente, se efectuó una simulación de posiciones restringidas en la que el esqueleto y las cadenas laterales de la proteína se fijaron en una región de coordenadas definidas al interior de la caja y cualquier desviación de las mismas se restringió mediante la aplicación de una fuerza armónica de 1000 N en cada una de las direcciones X, Y y Z. Generalmente esto se efectúa con el objetivo de favorecer la aproximación de las moléculas de disolvente hacia la proteína de tal forma que se genere una capa de hidratación o solvatación, tal como se esperaría en condiciones reales. La simulación se realizó por un equivalente a 200 ps y la lista de vecinos se actualizó cada 20 fs. EN seguida se llevó a cabo la simulación libre, también conocida como corrida productiva, en la que se eliminaron las restricciones sobre el cambio de posición de las partículas.

Comando	*.mdp	
Constraints	All bonds	Restricción sobre todos los átomos en su representación como armónicos simples.
Integrator	md	El integrador <i>md</i> es un algoritmo <i>leap-frog</i> para integrar ecuaciones de movimiento newtonianas.
Dt	0.002 ps	Número de pasos para la integración.
Nsteps	500 000 000	Número máximo de pasos a integrar.
Nstxout	500	Frecuencia con las que se escriben las coordenadas en el archivo de trayectoria.
Nstlist	10	Frecuencia con la que se actualiza la lista de vecinos.
Nstype	Grid	Crea una malla en la caja, permitiendo que el conjunto de átomos presentes en las celdas próximas en la malla sea el mismo cada vez que se construye la lista de vecinos.
Coulombtype	PME	Fast Particle-Mesh Ewald.

Vdwtype	Cut-off	Especifica el tratamiento de las interacciones de van der Waals.
Tcoupl	Berendsen	Acoplamiento de temperatura [K] en un baño con el termostato de Berendsen, con la constante de tiempo tau t [ps]. El termostato permite acoplar varios grupos por separado.
Pcoupl	Berendsen	El acoplamiento de la presión exponencial de relajación con la constante temporal tau p [ps].
Pcoupltype	Isotropic	Acoplamiento isotrópico de presiones con la constante temporal tau p [ps].

Fig. 40. En la página contigua se presenta una tabla que resume los parámetros relevantes incluidos en el archivo de extensión mdp empleado durante la simulación de 5 ns, que permite al usuario establecer los parámetros específicos requeridos por GROMACS.

El conformero más representativo de la parte final de la simulación se recuperó mediante el agrupamiento o *clustering* de los conformeros de acuerdo a su ocurrencia a lo largo de la simulación. El conformero obtenido se sometió a una minimización de energía empleando la paquetería incluida en GROMACS, hasta converger el sistema tras 5 000 pasos de simulación. Durante los 5 ns de dinámica molecular se observaron variaciones importantes en la estructura de AKIN γ con respecto a la conformación tridimensional del modelo inicial, generado por SAM-T08.

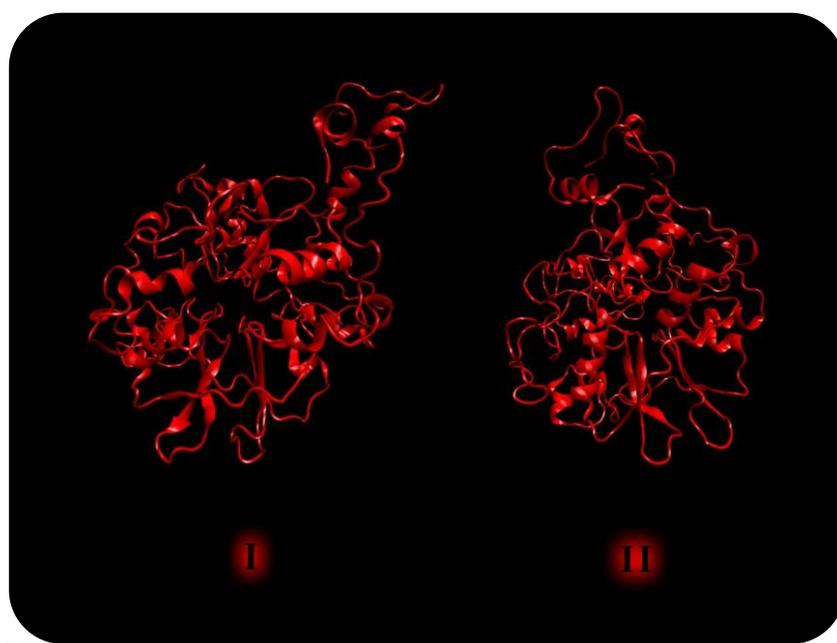
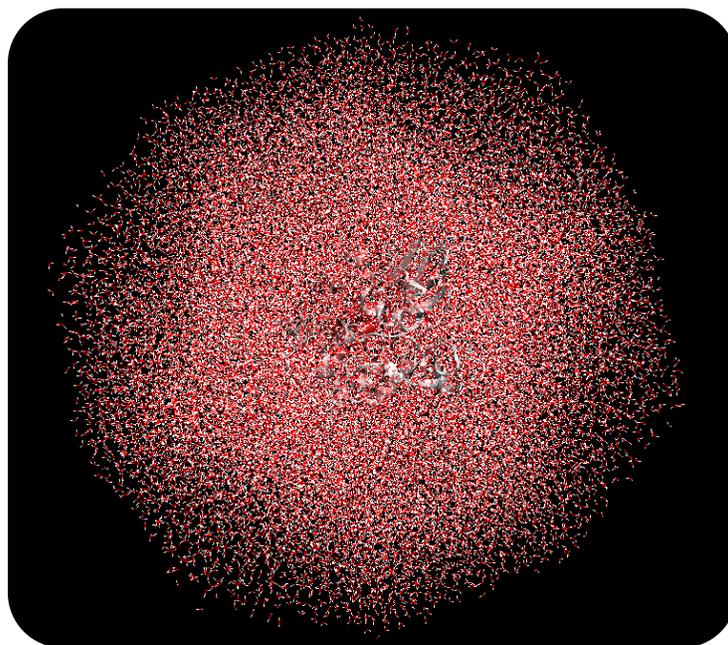


Fig.41. Se presenta la estructura del modelo inicial generado por SAM-T08 tras la minimización en Hyperchem (I), además del conformero más estable tras los 5 ns de simulación (II). En ambas estructuras es posible observar los motivos CBS (hélices α), dispuestos de manera relativamente simétrica, así como hojas β plegadas y un canal accesible a moléculas de disolvente en el centro de la subunidad.

Fig.42. Se presenta la estructura del conformero más estable tras la simulación en la caja de geometría octaédrica con las moléculas de H₂O (arriba). Abajo se observa un acercamiento de la estructura del conformero recuperado, es posible observar los motivos CBS (hélices α), dispuestos de manera relativamente simétrica, así como hojas β plegadas y un canal accesible a moléculas de disolvente en el centro de la subunidad.



El análisis de la dinámica se realizó al seguir las variaciones en la energía total del sistema. Por otro lado, con el objetivo de analizar los cambios estructurales relevantes y desviaciones con respecto al modelo estructural original, se realizaron gráficos de desviación cuadrática media RMSD y RMSE, además de un análisis del radio de giro de la proteína, así como de modos normales de vibración de la misma bajo las condiciones previamente enunciadas.

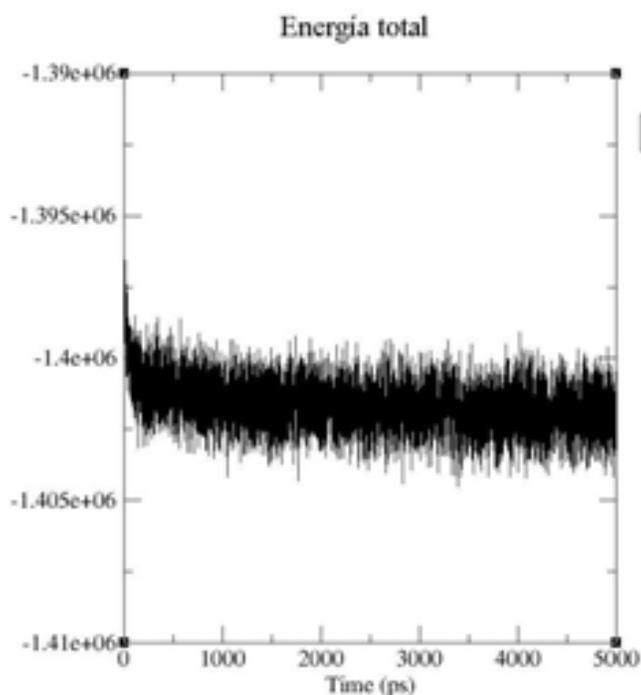


Fig.43. Gráfico de Energía total. Se presentan las variaciones en la energía total del sistema que comprende a la proteína AKIN γ en H₂O durante 5 ns de dinámica MD. Es posible observar que la energía del sistema se comporta estocásticamente, sin presentarse oscilaciones importantes a partir de los primeros 1.5 ns.

A partir del gráfico del RMSD (Fig. 44), y particularmente, del gráfico de radio de giro contra tiempo de simulación (Fig. 46), podemos concluir inicialmente que el tiempo de simulación resultó insuficiente para lograr la convergencia del esqueleto de la proteína hacia un conformero o conjunto de los mismos en equilibrio. Los movimientos del esqueleto de AKIN γ resultan notorios, indicando que la proteína presenta gran movilidad durante el tiempo de dinámica, sin alcanzar un *plateau*.

En la Fig. 45, puede observarse el RMSF promedio a lo largo de la simulación por átomo de los vectores propios de la proteína. Los resultados muestran que las regiones amino y carboxilo presentan variaciones importantes, en tanto que los átomos centrales de la proteína muestran movimientos restringidos. Debe destacarse la movilidad de los grupos de átomos comprendidos entre 250-550 y 900-1100.

Lo anterior puede justificarse por el hecho de que la subunidad reguladora bien puede presentar una estabilidad marginal debido a que durante la simulación ésta no se encuentra en complejo con las otras subunidades que conforman el heterotrímero SnRK1, siendo también posible que la subunidad converja al aumentar el tiempo de simulación. La simulación no se extendió por razones de tiempo, ya que el poder de cómputo requerido para un sistema de 424 residuos es considerable.



Fig.44. Gráfico de la desviación cuadrática media RMSD del backbone de la proteína AKIN γ . Se observan los cambios en la estructura tridimensional de la proteína durante 5 ns de simulación. Es posible apreciar que el sistema no ha alcanzado la condición de equilibrio.

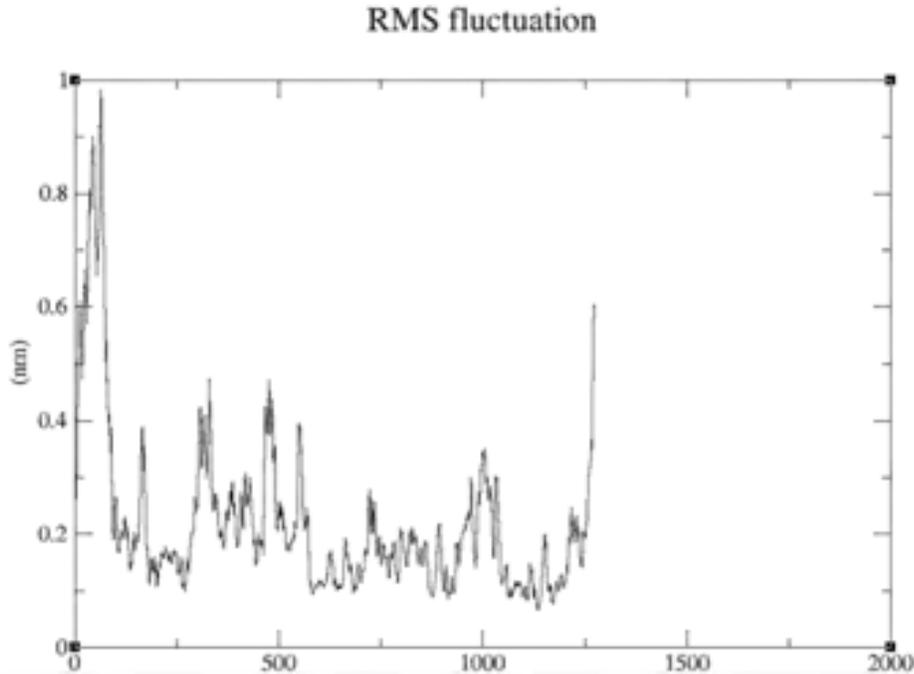


Fig.45. Gráfico de la fluctuación de la desviación cuadrática media RMSF Vs los átomos de los vectores propios de la proteína AKIN γ . Indica que las regiones que ocupan los átomos comprendidos dentro de los intervalos 0-100, 260-550, 900-1100 y la región del carboxilo terminal presentan gran movilidad. El eje de las abscisas corresponde al número de átomos presentes en la macromolécula.

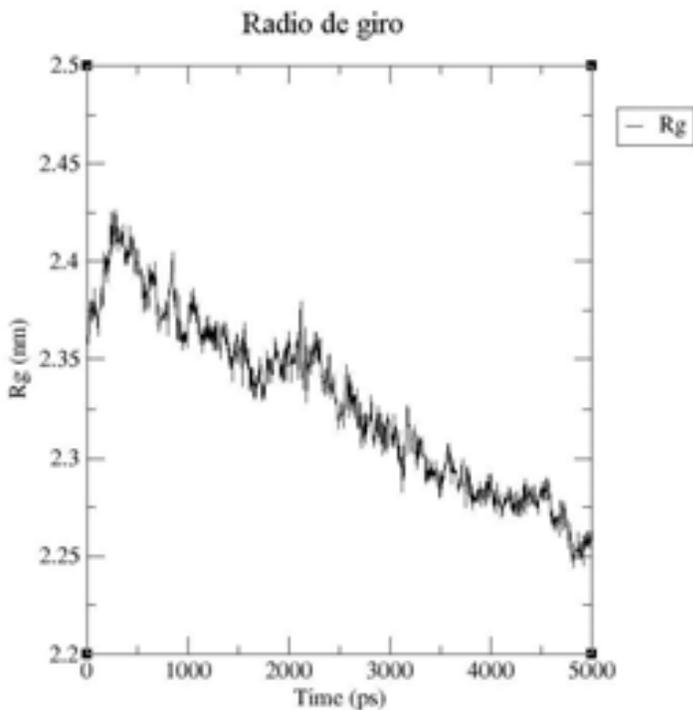


Fig.46. El radio de giro (R_g), indica la tendencia de la estructura tridimensional de la proteína AKIN γ a adquirir una conformación globular durante la simulación; también se puede interpretar como una medida del tamaño de la proteína. El radio de giro se define como la desviación cuadrática media de un grupo de átomos con respecto a su centro de gravedad.

La estructura inicial generada por SAM-T08 (AKINsm_hc_bo_a-O) y el confórmero estable o *cluster* final (AKIN4md_mmBO_a-O) de la simulación de MD fueron calificados mediante algoritmos de plegamiento inverso de proteínas a partir de las coordenadas relativas al esqueleto en un espacio tridimensional. Este algoritmo se ejecuta eliminando la información de la secuencia del modelo, manteniendo el esqueleto de la proteína, a partir del cual un programa genera cientos de secuencias compatibles con las coordenadas. Dichas secuencias se integran a un modelo estadístico empleado para sondear las bases de datos de secuencias en búsqueda de aquellas secuencias que, teóricamente, resultarían compatibles con las coordenadas relativas al esqueleto. La idea general consiste en que un modelo dado, recupere su secuencia original y las de sus homólogas a partir de las bases de datos, con bajas probabilidades de error y una *calificación de pertenencia* al modelo alta, es decir con valores estadísticamente significativos. Para evaluar la exactitud de un modelo, se busca rescatar la secuencia original introducida, así, es factible definir una estructura tridimensional adecuada, que además de ser termodinámicamente estable resulte biológicamente correcta.

```

Query HMM:   AKINsm_hc_bo_a-O
Accession:   [none]
Description: [none]
[HMM has been calibrated; E-values are empirical estimates]

Scores for complete sequences (score includes all domains):
Sequence      Description      Score      E-value      N
-----
gi|21592917|gb|AAM64867.1|      unknown [Arabido      -1.0      0.092      1

Parsed for domains:
Sequence      Domain      seq-f      seq-t      hmm-f      hmm-t      score      E-value
-----
gi|21592917|gb|AAM64867.1|      1/1      1      424      []      1      424      []      -1.0      0.092

Alignments of top-scoring domains:
gi|21592917|gb|AAM64867.1|: domain 1 of 1, from 1 to 424: score -1.0, E =
0.092

          *->vedeylikeshhnsnGrdmksdsPedGqrGptiweflwtldssssDD
          +   ik   +s G+   sPe   + + ++ + s +
gi|2159291      1      MATVPEIKIMRSESLGHRSDVSSPEAKLGMRVEDLWDEQKPOLSPNE 47

          hsptGyyPdssssvssssnPysssslslstakssnesaerhGdnssPstG
          + ++ +   + s+   ss+   s+   +++ ++ +++   s+P
gi|2159291      48      KLNACFESIPVSFAFPLSSDSQDIEIRSDTSLAEAVQTLKFKVLSAPVVD 97

```

```

nstylekkdeedaklGeekdeGkeeyykehDdDpddsdsAkrsGsGqqssh
+e +d+ G + G + ++ + p + A + +G
gi|2159291 98 VDAPEDasWIDRYIGIVEFPgIVVWLLHQLEPPSPRSPAVAASNGFSHDF 147

dsndqdeAawgDGsGGmkdyhpdnwhdesvpseafsGDstGPdPnDiFah
+ d+ + sG + e+ + ++ sG + + + ++
gi|2159291 148 TTDVLDNGDSAVTSGNFFFEVLTSSELYENTKVRDISGTFRWAPFLALQKE 197

rsdreilrelaksysssPvAGPGlGdLkssitksGstalglanAGrvel
s +l l k +s+Pv G +++ it+sG + AG++ +
gi|2159291 198 NSFLTMLLLLLSKYKMKsIPVVDLGVAKIENIITQSGVIHMLAECAGLLWF 247

mkkGaqvlAknGhtassyhfvlkeqaPrGegsfrvvrdaGslpdiak
G++ l G s h + + e P ++ + r+ G++p i++
gi|2159291 248 EDWGIKTLSEVGLPIMSKDHIIKIYEDEPVLQAFKLMRRKRIGGIPVIER 297

kGeepeGftssnsslkltkypkidkynfnGaakiwknnvnngdGsigddg
+ e+p G +s + + l p+i + + ++k + v + + gd +
gi|2159291 298 NSEKPVGNISLRDVQFLlTAPEIYHDYRSITTKNFLVSVREHLEKCGDTS 347

aPGrgGkfrdsDnssstdkdlfstYlnsGgivhsandGrakGlsssttql
aP +G n ++ l+ ++ i ++ G+ +Gl +++ +
gi|2159291 348 APIMSGVIACTKNHTLkELILMLDAEKIHRIYVVDEFGNLEGLITLRDII 397

eylmEvppqrvGgsdqGdsnidknass<-*
l+ p G +G ++n+
gi|2159291 398 ARLVHEPSGYFGDFFDGVMPLPENYRV 424

```

Query HMM: [AKIN4md_mmBO_a-0](#)

Accession: [none]

Description: [none]

[HMM has been calibrated; E-values are empirical estimates]

Scores for complete sequences (score includes all domains):

Sequence	Description	Score	E-value	N
gi 15228397 ref NP_190422.1	KING1 (SNF1-RELATED)	58.9	1.4e-11	1

Parsed for domains:

Sequence	Domain	seq-f	seq-t	hmm-f	hmm-t	score	E-value
gi 15228397 ref NP_190422.1	1/1	1	424	[]	1 424	[]	58.9 1.4e-11

Alignments of top-scoring domains:

gi|15228397|ref|NP_190422.1|: domain 1 of 1, from 1 to 424: score 58.9, E = 1.4e-11

gi 1522839	1	*->aptkkyikqalqittDsittetspkdllavkveevykklnlfwpti +t ik + + sp+ l ++ve + k p MATVPEIKIMRSESLGHRSDVSSPEAKLGMRVEDLWDEQKPOLSPNE	47
gi 1522839	48	keantnsDldlds fayssdsfsiitkpewlleaeiaelGnsftegfgd k+ + +f+ ssds +i ++ + l+ea +++++ + +++ d KLNACFESIPVSAPFLSSDSQDIEIRSDTSLAEAVQTLKFKVLSAPVVD	97
gi 1522839	98	eGqeqvakleeilkkvdsekalqiiakyfkipgfPyAAFVSDSNKNSGL ++ a + +++++ + + p P + v sn+ + + VDAPEDASWIDRYIGIVEFPGIVVWLLHQLEPPSPRSPAVAASNGFSHDF	147
gi 1522839	148	tnvkiFpFqfnmLPGPlheniygtvfharlptkmtDgpfndivseqllae t + G + e + + + + + G f l + e TTDVL DNGDSAVTSGNFFEVLTSSELYKNTKVRDISGTFRWAPFLALQKE	197
gi 1522839	198	asweeamkrwlkynvealavvlpGqpivlTttittygltdiqtkvinnrem +s +++ ky +++++ vv +G +tit++g+ + ++ NSFLTMLLLLLSKYKMKSI PVVDLGVAKIENIITQSGVIHMLAECAGLLWF	247
gi 1522839	248	iekglryPsatGaltlaiqkndlrfrkkeGptliyiieilkedvgGvpvlse g + s+ G +++++ + ++ e + + + ++ +gG+pv++ EDWGIKTLSEVGLPIMSKDHIIKIYEDEPVLQAFKLMRRKRIGGIPVIER	297
gi 1522839	298	dGtepkGlisrvyaddiltlpqlhiDddehtkaaariqmthtvGkareDg + ++p G is + +lt+p+++ D t + + + + k + NSEKPVGNISLRDVQFLLTAPEIYHDYRSITTKNFLVSVREHLEKCGDTS	347
gi 1522839	348	ePissdvpafyaedkqqkllifmnkdnkqsviiiatttyviGvytaeefl Pi s+v a ++ +l+ +++ + + + ++ + G++t +++++ APIMSGVIACKNHTLKEILMLDAEKIHRIVVDDFGNLEGLITLRDII	397
gi 1522839	398	kqmaqlDrdktGdhdsGadyfPPlyPi<-* +++++ Gd +G +P y + ARLVHEPSGYFGDFDGVMLPENYRV	424

Fig. 47. Resultado de las búsqueda de secuencias en la base de datos RefSeq que presentan correspondencia con los modelos inicial (**AKINsm_hc_bo_a-O**) y final (**AKIN4md_mmBO_a-O**) de AKIN γ de acuerdo a los algoritmos Rosetta HMMER. Las secuencias se evaluaron con un cut-off de 1×10^{-2} . El consenso de Rosetta HMMER indica con el símbolo de adición (+) que existe cierta coincidencia de residuos entre el modelo y la secuencia blanco, en letras minúsculas (n) se muestra la conservación relativa de residuos, en tanto que en letras mayúsculas (N) se muestra la conservación total del mismo residuo de aminoácido. Valores numéricos altos del score indican una mayor significancia estadística y una menor probabilidad de error. El valor de E (expectancia) se relaciona con

la probabilidad de extraer una secuencia por azar, valores cercanos a cero indican que la probabilidad de que la secuencia haya sido encontrada por casualidad es despreciable.

En un trabajo por publicar del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres en colaboración con el Dr. León Martínez Castilla, se demostró que un algoritmo de esta naturaleza (Rosetta Module Design V 2.3 y HMMER 2.3.2 (Oct 2003) Copyright ^(C) 1992-2003 [HHMI/Washington University School of Medicine]) , puede ser aplicado con éxito para obtener la secuencia de la proteína correspondiente al emplear las coordenadas contenidas en los archivos del banco de datos cristalográfico de proteínas (PDB), los cuales recuperan su secuencia con un *score* de coincidencias alto y un valor de expectativa o E-value cercano a cero. Además, se puso de manifiesto que este procedimiento no incurre en falsos positivos.

La búsqueda HMMER se efectuó contra la base de datos Reference Sequences RefSeq de la NCBI, que integra secuencias sin redundancia y debidamente anotadas. Se debe recordar que el parámetro E da cuenta de la probabilidad que existe de que la secuencia fuera extraída por azar, sin estar relacionada con el modelo HMMER, en tanto que el *score* es un índice de los aa que encontraron correspondencia dentro del modelo estadístico. Tal como se puede observar en la Fig.47, al calificar Rossetta HMMER el confórmero final tras la simulación de dinámica molecular, se obtuvo un valor de E de 1.4×10^{-11} y un *score* de 58.9, de mayor relevancia que los valores relativos al modelo inicial de 0.092 y -1.0.

Con base en el resultado provisto por Rosetta HMMER, podemos concluir que el modelo inicial generado por el servidor SAM-T08, si bien recupera la secuencia de una proteína emparentada con AKIN γ , lo hace con una calificación negativa (-1) y una expectancia marginalmente significativa (0.092). Por otra parte, el confórmero más representativo de la proteína durante la simulación de 5 ns corresponde con la secuencia de una proteína clasificada como gi|15228397|ref|NP_190422.1|KING1, una cinasa relacionada a SNF1 en plantas y que es idéntica a la secuencia de la que se partió para construir el modelo tridimensional.

Tal como se muestra a continuación, existe gran conservación de residuos entre las secuencias gi|4506061 [AMPK γ_1 *Homo sapiens*], gi|48675947 [AMPK γ_1 *Sus scrofa*], gi|89886129 [AMPK γ_1 *Bos taurus*] y gi|149714260 [Proteína predicha *Equus caballus*], así como una menor coincidencia entre las secuencias anteriores y las secuencias gi|18390971 [Homóloga a SNF4] y gi|15228397 [KING1] pertenecientes a plantas.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50
gi|4506061 -----
gi|4867594 -----
gi|8988612 -----
gi|1497142 -----
gi|1839097 MFGSTLDSSR GNSAASGQLL TPTRFVWPYG GRRVFLSGSF TRWTEHVPMS
gi|1522839 -----
Clustal Co -----MATV

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      60      70      80      90     100
gi|4506061 -----
gi|4867594 -----
gi|8988612 -----
gi|1497142 -----
gi|1839097 PLEGCPTVFQ VICNLTDPGYH QYKFFVDGEW RHDEHQPFVS GNGGVVNTIF
gi|1522839 PEIKIMRSES LGHRSDVSSP EAKLGMRVED LWDEQKQOLS PNEKLN----
Clustal Co -----

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     110     120     130     140     150
gi|4506061 ----- METVISSDSS PAVENEHPQE TPESNNSVYT S-----
gi|4867594 ----- METVTSSDSS SAVENEHPQD TPESNNSVYT S-----
gi|8988612 ----- MEAVPSSDSY PAVENEHLQE TPESNNSVYT S-----
gi|1497142 ----- METATSSDGH PALENEHHQE TPESNNSVYT S-----
gi|1839097 ITGPDMPAG FSPETLGRSN MDVDDVFLRT ADPSQEAVPR MSGVDLELSR
gi|1522839 ---ACFESIP VSAFPLSSDS QDIEIRSDTS LAEAVQTL SK FK-----
Clustal Co ... .. :: : :::

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     160     170     180     190     200
gi|4506061 -----FMKSH RCYDLIPTSS KLVVFDTS LQ VKKAFFALVT NGVRAAPLWD
gi|4867594 -----FMKSH RCYDLIPTSS KLVVFDTS LQ VKKAFFALVT NGVRAAPLWD
gi|8988612 -----FMKSH RCYDLIPTSS KLVVFDTS LQ VKKAFFALVT NGVRAAPLWD
gi|1497142 -----FMKSH RCYDLIPTSS KLVVFDTS LQ VKKAFFALVT NGVRAAPLWD
gi|1839097 HRISVLLSTR TAYELLPE SG KVIALDVNLP VKQAFHILYE QGIPLAPLWD
gi|1522839 -----VLSAP VVDVDAPEDA SWIDRYIGIV EFPGIVVWLL HQLEPPSPRS
Clustal Co ...: * .. . : .: .: : : .. .

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|
     210     220     230     240     250
gi|4506061 SKKQSFV GML TITDFINILH RYYKS-ALVQ IYELEEHKIE TWREVYLQDS
gi|4867594 SKKQSFV GML TITDFINILH RYYKS-ALVQ IYELEEHKIE TWREVYLQDS
gi|8988612 SKKQSFV GML TITDFINILH RYYKS-ALVQ IYELEEHKIE TWREVYLQDS
gi|1497142 SKKQSFV GML TITDFINILH RYYKS-ALVQ IYELEEHKIE TWREVYLQDS
gi|1839097 FGKGQFV GVL GPLDFILILR ELGTHGSNLT EEELEHTHIA AWKEGKAHIS
gi|1522839 PAVAASNGFS --HDFITDVL DNGDSAVTSG NFFEVLTSSE LYKNTKVRDI
Clustal Co *. ** : . ::: :

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

```

                260      270      280      290      300
gi|4506061  ----- FKPLVCISPN ASLFDVAVSSL IRNKHRLPV IDP--ESGNT
gi|4867594  ----- FKPLVCISPN ASLFDVAVSSL IRNKHRLPV IDP--ESGNT
gi|8988612  ----- FKPLVCISPN ASLFDVAVSSL IRNKHRLPV IDP--ESGNT
gi|1497142  ----- FKPLVCISPN ASLFDVAVSSL IRNKHRLPV IDP--ESGNT
gi|1839097  RQYDGSGRPY PRELVQVGPY DNLKDVALKI LQNVAAVAV IYSSLQDGSY
gi|1522839  SG-----TFR WAFFLALQKE NSFLTMLLLL SKYKMSIPV VDLG--VAKI
Clustal Co      *:: :      :      :      : * : ** :      ..

```

```

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                310      320      330      340      350
gi|4506061  LYILTHKRIL KFLKLFITEF PKPE----FM SKSLEELQIG TYAN-----
gi|4867594  LYILTHKRIL KFLKLFITEF PKPE----FM SKSLEELQIG TYAN-----
gi|8988612  LYILTHKRIL KFLKLFITEF PKPE----FM SKSLEELQIG TYAN-----
gi|1497142  LYILTHKRIL KFLKLFITEF PKPE----FM SKSLEELQIG TYAN-----
gi|1839097  PQLLHLASLS GILKICCRYF RHSSSSLPIL QQPICSIPLG TWVPRIGESS
gi|1522839  ENIITQSGVI HMLAECAGLL WFED----WG IKTLSEVGLP IMSK-----
Clustal Co      :: : * :      .      :      : : : :

```

```

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                360      370      380      390      400
gi|4506061  ---IAMVRTT TPVYVALGIF VQHRVSALPV VDEKGR--VV DIYSKFDVIN
gi|4867594  ---IAMVRTT TPVYVALGIF VQHRVSALPV VDEKGR--VV DIYSKFDVIN
gi|8988612  ---IAMVRTT TPVYVALGIF VQHRVSALPV VDEKGR--VV DIYSKFDVIN
gi|1497142  ---IAMVRTT TPVYVALGIF VQHRVSALPV VDEKGR--VV DIYSKFDVIN
gi|1839097  SKPLATLRPH ASLGSALALL VQAEVSSIPV VDDNDS--LI DIYSRSDITA
gi|1522839  -DHIKIYED EPVLQAFKLM RRRKRIGGIPV IERNSEKPGV NISLRDVQFL
Clustal Co      : :      : * : : : : : : : : : * :

```

```

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                410      420      430      440      450
gi|4506061  LAAEKTYNNL D-VSVTKALQ HRSHYFEG-- -----V LKCYLHETLE
gi|4867594  LAAEKTYNNL D-VSVTKALQ HRSHYFEG-- -----V LKCYLHETLE
gi|8988612  LAAEKTYNNL D-VSVTKALQ HRSHYFEG-- -----V LKCYLHETLE
gi|1497142  LAAEKTYNNL D-VSVTKALQ HRSHYFEG-- -----V LKCYLHETLE
gi|1839097  LAKDKAYAQI H-LDDMTVHQ ALQLGQDASP PYGIFNGQRC HMCILRSDSLV
gi|1522839  LTAPEIYHDY RSITTKNFLV SVREHLEKCG DTSAPIMSGV IACTKNHTLK
Clustal Co      * : * :      :      :      :      * : : *

```

```

                ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                460      470      480      490      500
gi|4506061  TIINRLVEAE VHRLVVVDE- NDVVKGIVSL SDILQALVLT GGEKPP----
gi|4867594  TIINRLVEAE VHRLVVVDE- NDVVKGIVSL SDILQALVLT GGEKPP----
gi|8988612  TIINRLVEAE VHRLVVVDE- NDVVKGIVSL SDILQALVLT GGEKPP----
gi|1497142  TIINRLVEAE VHRLVVVDE- NDVVKGIVSL SDILQALVLT GGEKPP----
gi|1839097  KVMERIANPG VRRLVIVEAG SKRVEGIISL SDVFQFLLGL -----
gi|1522839  ELILMLDAEK IHRIVVDD- FGNLEGLITL RDIIARIVHE PSGYFGDFFD
Clustal Co      : : *      : : * : * : : : * : * : * : * :

```

```

                ....|....| .
                510

```

```

gi|4506061      ----- -
gi|4867594      ----- -
gi|8988612      ----- -
gi|1497142      ----- -
gi|1839097      ----- -
gi|1522839      GVMPLPENYR V
Clustal Co

```

Fig.48. En el alineamiento efectuado por CLUSTAL en color gris continuo se muestran los residuos conservados en todas las secuencias incluidas. Llama la atención que en caso de las subunidades de mamífero existen residuos conservados que no están presentes en la subunidades reguladoras AKIN γ de plantas.

Utilizando las herramientas del visualizador de estructuras moleculares VMD (Visual Molecular Dynamics), se obtuvieron las imágenes que se presentan a continuación y que dan cuenta de las características estructurales del modelo inicial generado por SAM-T08 y los conformeros representativos durante la simulación de MD obtenidos durante el *clustering*. Visualmente es posible reconocer algunas características estructurales presentes en los cristales resueltos de la homóloga de mamífero y *Saccharomyces cerevisiae*.

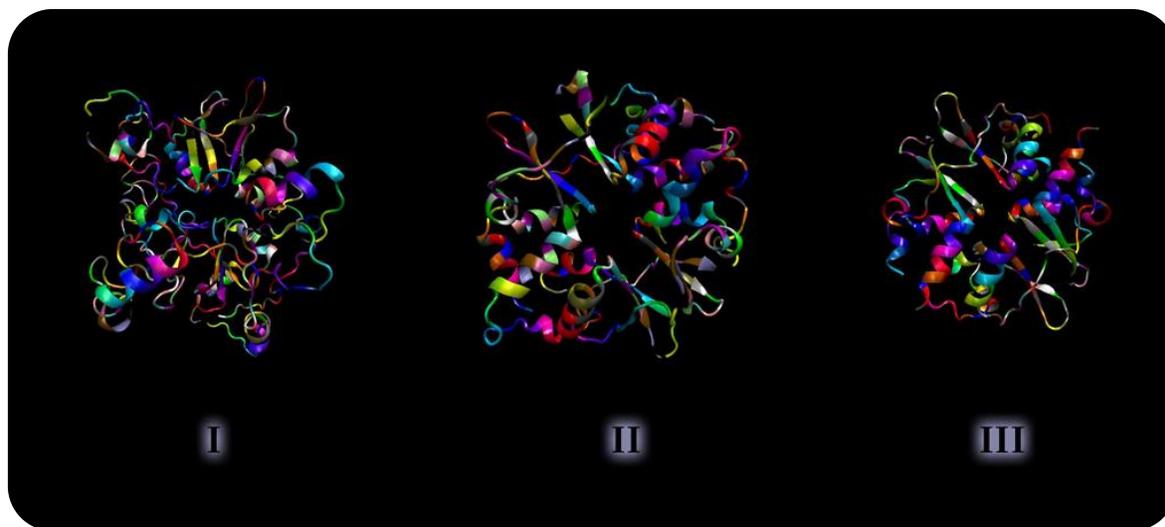


Fig.49. Estructuras tridimensionales del modelo final de AKIN γ (I), el cristal de la subunidad AMPK γ_1 (2V8Q) obtenida por [43] (II) y la subunidad SNF4 (2NYE) resuelta por [68](III).

Las estructuras tridimensionales del modelo y sus homólogos (Fig. 49), presentan arquitecturas similares; se trata de discos elípticos con dimensiones aproximadas de 60 Å de

diámetro por 30 Å de ancho. En cada subunidad reguladora γ es posible identificar los motivos estructurales observados como una repetición hélice-giro-hélice. Los pares de CBS₁, CBS₂, CBS₃ y CBS₄ se empaquetan en forma de hojas β antiparalelas, generando los dos dominios Bateman y dando paso a un dímero *cabeza-a-cabeza* a través de dos interfaces dominadas por un par de α hélices por cada motivo CBS.

Este acomodo espacial genera ejes de simetría binarios o de segundo orden, que se intersectan sobre un canal accesible a moléculas de disolvente, que atraviesa el centro de la subunidad. Cada motivo CBS contribuye como sitio potencial de unión localizado en un bolsillo superficial formado entre las hojas β interfaciales de cada dominio Bateman. El estado ocupacional de cada sitio de unión varía entre estructuras.

Inicialmente se estableció que en la subunidad de mamíferos, los sitios relativos a los CBS₁, CBS₃ y CBS₄ se encontraban ocupados por AMP, en tanto que en la estructura de *S. pombe* se demostró que el CBS₄ puede estar ocupado por AMP, ZMP (5-aminoimidazol-4-carboximida-1- β -D-ribofuranosil 5'-monofosfato ó AICAR), ATP y el CBS₂ por ADP, aunque no se tiene evidencia de que la activación del complejo SNF1, sea dependiente de la unión de nucleótidos [68]. En el caso de CBS₄ de mamíferos, el AMP no es intercambiable por ATP.

Una de las explicaciones que se da al hecho de que el AMP unido al CBS₄ no sea intercambiable por ATP en la subunidad reguladora γ_1 , se infiere a partir de la comparación entre las características estructurales de los sitios ocupados. Como se ha dicho, los motivos CBS se localizan entre pares de hélices-giros-cadenas, con un residuo de Asp (localizado en el primer giro de la hélice alfa adyacente) capaz de formar puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la ribosa. El segmento de adenina del nucleótido unido se encuentra dentro de un bolsillo hidrofóbico, formando puentes de hidrógeno con grupos de la cadena principal de hojas beta, en tanto que el fosfato interactúa con cadenas básicas; la ausencia de residuos básicos puede explicar porque el complejo SNF1 de levadura no es activado por AMP. En cambio, el AMP en el sitio no intercambiable (CBS₃) resulta mayormente estabilizado mediante interacciones entre los grupos hidroxilo de la ribosa y la Thr¹⁹⁹ localizada entre los motivos CBS₂ y CBS₃, y entre el grupo fosfato y los residuos de Ser²²⁵ y Ser³¹⁵. Las diferencias en la unión indican que los sitios deben poseer afinidades muy diferentes por los nucleótidos.

Al enlazarse el ATP a sitios intercambiables, promueve un reacomodo estructural mínimo; aparentemente la subunidad no presenta una mayor afinidad por el nucleótido libre ó en complejo con Mg (II)-ATP, ya que los iones no interactúan directamente con la proteína. Igualmente, se favorece el reacomodo de algunos residuos básicos para evitar el impedimento estérico que sugeriría la presencia de los fosfatos beta y gamma del nucleótido.

En el cuarto sitio potencial (CBS₃), el residuo de Asp es sustituido por Arg, por lo que no se encuentra disponible para interactuar con los grupos OH 2' y 3', de la ribosa y estabilizar la unión del nucleótido. En el caso de *S. pombe*, el ADP ocupa el sitio CBS₂ independientemente de que tipo de nucleótido se encuentra enlazado al sitio CBS₄. El residuo de D²⁴⁹ de interés, se dispone directamente sobre el bolsillo característico del motivo CBS₂, interactuando con los oxhidrilos de la ribosa en el ADP. Aunado a lo anterior, se sabe que el motivo CBS₂ en mamíferos aporta la mayor parte de los residuos básicos presentes en el canal accesible a moléculas de disolvente, que interactúa con los grupos fosfato de nucleótidos enlazados. Por lo anterior, se considera que el motivo CBS₂ resulta de gran relevancia para favorecer las interacciones $\alpha\beta\gamma$ que modulan la actividad de complejo [26].

Para realizar una comparación estricta entre las subunidades AKIN γ y AMPK γ_1 , se llevó a cabo un análisis mediante el alineamiento estructural del cristal relativo a la isoforma γ_1 (2V8Q) y la estructura del confórmero más representativo durante la simulación. El alineamiento estructural realizado por el ambiente MultiSeq, incluido en el visualizador VMD, se observa que si bien existen regiones que ambas estructuras comparten (hélices α y hojas β plegadas), la superposición solamente es total en una de las hélices pertenecientes al motivo CBS que correspondería al CBS₄ (no intercambiable) de acuerdo a la nomenclatura propuesta por [43]. De igual forma, es notoria la presencia de un canal accesible al disolvente en el centro de ambas subunidades.

Por medio de un segundo alineamiento estructural efectuado por TOPOFIT, programa que emplea la triangulación tridimensional de Delaunay, pudo comprobarse que únicamente en la región que comprende a una de las hélices α que conforma al CBS₄ existe gran similitud estructural, de tal forma que es posible observar el traslape de ambas estructuras tridimensionales en dicha región.

El análisis efectuado por los algoritmos Rosetta HMMER sobre el grado de conservación estructural y de residuos relevantes para la unión de nucleótidos, permitió determinar que si bien las secuencias de *Arabidopsis thaliana* alineadas cuentan con valores del parámetro E y *score* aceptables no presentan una conservación puntal de los residuos de aminoácidos capaces de interactuar con el AMP en la subunidad de mamíferos. Al estudiar el cristal de mamíferos en complejo con tres equivalentes de AMP, se estableció que la interacción con los mismos no solamente es mediada por residuos de D, S, T e H, sino también por residuos de R, ya que éstas estabilizan la unión del nucleótido al favorecer la formación de interacciones en las cuales la distancia entre el residuo de la proteína y los oxidrilos del AMP es característica de puentes salinos.

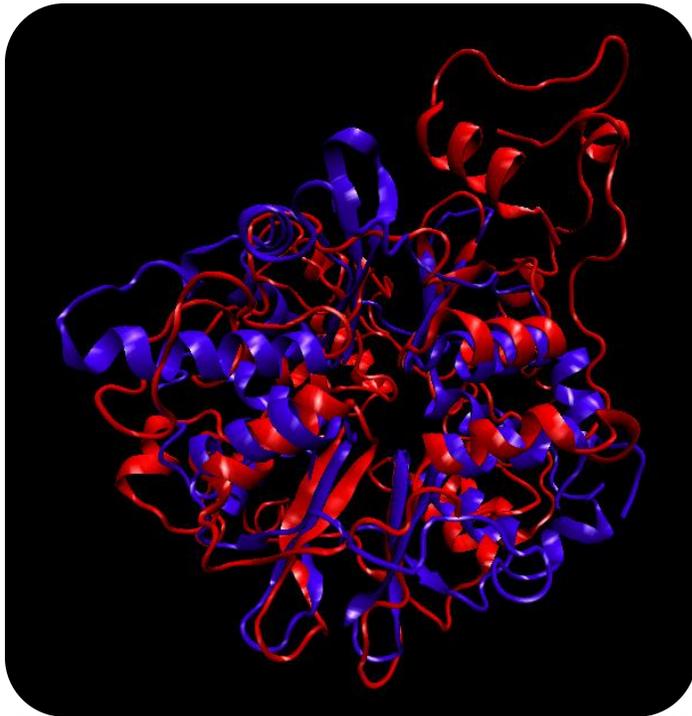


Fig.50. Alineamiento estructural generado por MultiSeq. En azul se muestra la estructura tridimensional de la subunidad AMPK γ_1 , mientras en rojo se puede apreciar la estructura del modelo relativo a AKIN γ .

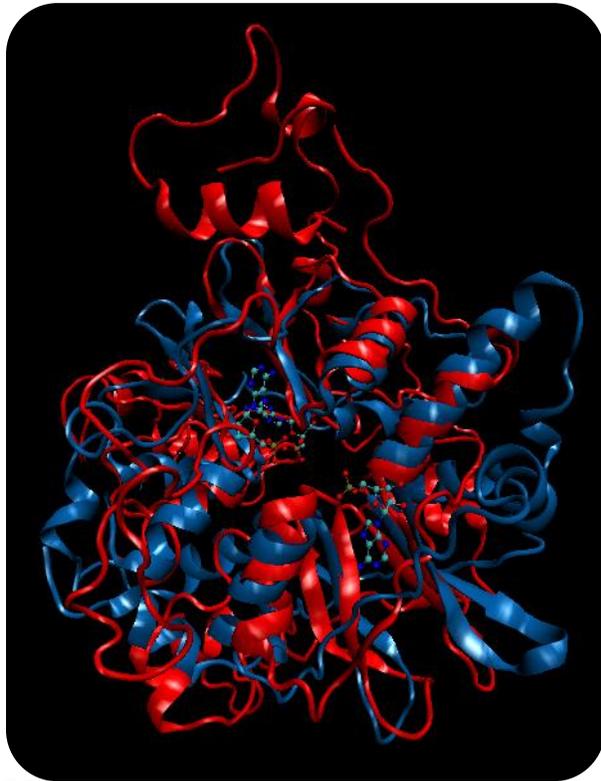


Fig.51. Alineamiento estructural generado por TOPOFIT. En azul agua se muestra la estructura tridimensional de la subunidad AMPK γ_1 , mientras en rojo se observa la estructura del modelo de la subunidad AKIN γ . Dispuestos alrededor del canal accesible al disolvente y las hélices a que conforman a los motivos CBS se observan tres moléculas de AMP.

A juzgar por la presencia de los residuos relevantes para la unión del nucleótido en posiciones equivalentes a las de la estructura de AMPK γ_1 , la subunidad AKIN γ también cuenta con los bolsillos o sitios de unión a AMP.

A pesar de que, como se dijo, algunos residuos implicados en la interacción de la subunidad reguladora γ_1 con nucleótidos de adenosina no se encuentran presentes en la subunidad de

plantas, se verificó mediante el alineamiento de secuencias y con ayuda del visualizador VMD (en el cual se hicieron explícitas las distancias y se analizó el tipo de interacciones presentes entre los residuos de la proteína) que los siguientes residuos resultan potencialmente capaces de participar en la unión de nucleótidos mediante puentes salinos (1.8-3.4 Å) ó puentes de hidrogeno (2.6-3.5 Å): E¹¹⁵, D¹⁰⁸, D¹²⁴, R¹¹⁸, D⁷, D⁷⁵ y D⁷⁷, E²³² y E²⁷⁴. Cabe destacar que por formalidad, para el análisis se consideraron únicamente las distancias menores a 4.0 Å para definir las interacciones con el AMP.

Con base en los resultados, podemos afirmar que el modelo tridimensional describe adecuadamente la proteína a partir de cuya secuencia fue modelado. Aún cuando existen diferencias importantes entre las secuencias pertenecientes a la subunidad reguladora γ_1 del complejo AMPK de mamíferos y las dos secuencias de *Arabidopsis thaliana* que se alinearon con el modelo de acuerdo a Rosetta HMMER, en especial en cuanto a la conservación de los residuos

implicados en la interacción con nucleótidos se refiere, existe la posibilidad de que en la realidad biológica la subunidad AKIN γ retenga la capacidad de unir nucleótidos y desempeñe un papel fisiológico semejante al de sus homólogas, al modular la capacidad del complejo SnRK1 para redirigir el metabolismo de las plantas hacia vías alternativas implicadas en la respuesta a diversos tipos de estrés, pues se debe recordar que, si bien aún se desconoce el mecanismo de activación alostérica de los complejos homólogos AMPK, SNF1 y SnRK1, se considera que la sensibilidad de los heterotrímeros ante las variaciones en el estado energético celular recae en las subunidades reguladoras γ .

Apéndice II: Filogenia molecular de AKIN β AKIN γ y AKIN $\beta\gamma$

Se efectuó una búsqueda PSI-BLAST (**P**osition **S**pecific **I**terated **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) contra la base de datos de la NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, empleando como *query* la secuencia traducida del gen AT3G48530, que codifica a la subunidad reguladora AKIN γ en *Arabidopsis thaliana*. El PSI-BLAST es un perfil característico del BLAST 2.0 en el cual una matriz PSSM (Position Specific Scoring Matrix) es construida automáticamente a partir del alineamiento múltiple de secuencias con los valores más altos de *score* en una búsqueda BLAST inicial.

La matriz PSSM se genera al calcular el *score* relativo a la conservación de aa para cada posición del alineamiento; las posiciones altamente conservadas reciben valores altos de *score*, en tanto que las pobremente conservadas reciben valores cercanos a 0. El perfil generado de esta manera se emplea para llevar a cabo una segunda búsqueda BLAST y el resultado de cada iteración es usado para refinar el perfil; la estrategia iterativa aumenta la sensibilidad de la búsqueda de dominios de interés contenidos en secuencias de la base de datos de la NCBI.

Se obtuvieron alineamientos significativos de acuerdo a los valores del parámetro E y el *score*, recuperándose aproximadamente 100 secuencias tras efectuar 10 iteraciones. La matriz composicional utilizada para producir los alineamientos fue BLOSUM 62. El ensayo se efectuó bajo las condiciones que se enuncian a continuación: penalizaciones por Gap 10, Existencia 11, Extensión 1 y umbral de expectativa 0.001. Es importante mencionar que en filogenia molecular, el parámetro E da cuenta de la probabilidad que existe de que dos secuencias dadas se parezcan por

azar y no estén emparentadas evolutivamente, en tanto que el *score* es indicativo de los residuos de aa que encontraron correspondencia entre ambas secuencias.

La selección de secuencias se llevó a cabo considerando los valores numéricos de los términos cuantitativos de similitud e identidad, generados en el alineamiento efectuado durante el PSI-BLAST. La identidad indica la conservación o presencia de sitios idénticos en las secuencias alineadas, mientras que el criterio de similitud indica el parecido de las mismas en función de las propiedades fisicoquímicas de los aa que las constituyen.

Con base en lo anterior se recuperaron aquellas secuencias en formato FASTA que presentan una identidad mayor al 15 % con respecto al *query* y valores de E tendentes a 0 ó que resultaran menores a 10^{-14} . De igual forma, se descartaron aquellas secuencias que pertenecieran al mismo organismo. El procedimiento descrito también se llevó a cabo con los genes que codifican a las subunidades AKIN $\beta\gamma$ y AKIN β , codificadas por los genes AT1G09020 y [AT5G21170](#), respectivamente.

Al discriminar las secuencias recuperadas mediante el PSI-BLAST se obtuvieron las secuencias de genes traducidos, que codifican a diferentes isoformas de las subunidades reguladoras de los complejos heterotriméricos AMPK/SNF1/SnRK1. Al analizar las secuencias recuperadas se estableció que las subunidades AKIN γ y AKIN β poseen homólogas en el dominio de los eucariontes, distribuidas en un número considerable de especies. En cambio, secuencias de proteínas ortólogas a la subunidad atípica $\beta\gamma$ de *Arabidopsis thaliana* únicamente fueron encontradas en *Viridiplantae* y *Prasinophyceae*.

También se debe comentar que, en las tres búsquedas PSI-BLAST respectivas a cada tipo de subunidad, se encontraron secuencias de proteínas clasificadas en la base de datos de NCBI como predichas o desconocidas; sin embargo, al analizar su estructura de dominios se observó que presentaban los dominios característicos de las subunidades reguladoras β ó γ de los complejos AMPK/SNF1/SnRK1. En adición a lo anterior, al revisar nuevamente los dominios característicos de las subunidades estudiadas, se pudo observar que éstas presentaban variaciones importantes en la longitud de la secuencia o en la disposición de los dominios dentro de la misma, e inclusive en el caso de algunas de las subunidades γ de plantas, un motivo CBS adicional truncado.

Para conocer la relación evolutiva entre las subunidades reguladoras β y γ con la subunidad $\beta\gamma$, se construyeron árboles filogenéticos del tipo NJ (Neighbor Joining), generando alineamientos locales de las secuencias de las proteínas recuperadas mediante PSI-BLAST.

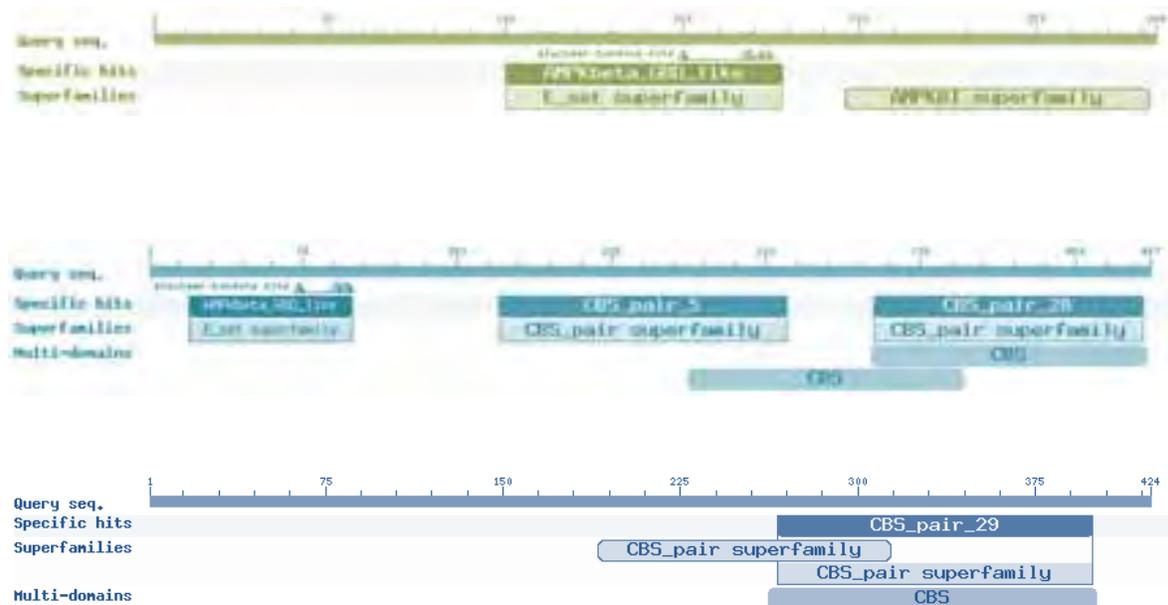


Fig.52. Estructura de dominios de las secuencias pertenecientes a AKIN γ , AKIN β y AKIN $\beta\gamma$, generados por el servidor de la NCBI. Alineamiento estructural generado por TOPOFIT.

Los alineamientos se construyeron utilizando CLUSTALX [Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. (1997)], empleando nuevamente la matriz composicional BLOSUM 62 y se refinaron manualmente al cortar las secuencias de proteínas $\beta\gamma$ en los dominios característicos de las subunidades β (GBD/SBD) y los dominios Bateman de las subunidades γ ; se consideraron por separado los dominios GBD/SBD y CBS debido a que se trata de regiones que pueden alinearse de manera no ambigua con las subunidades β y γ incluidas. No se emplearon todas las secuencias recuperadas para evitar problemas en la visualización y presentación de los árboles; los cuales se visualizaron con el programa TreeviewX Versión 0.5.1 [D. M. Page, Roderic GubuSoft 2006-2009].

La comparación de las secuencias permitió establecer que las subunidades β de mamíferos son muy diferentes entre sí, tal como se observa en el árbol NJ (Fig. 52), en la parte superior del

árbol se disponen secuencias de proteínas β como miembros únicos (*C. familiaris* y *M. musculus*) en las ramas. La presencia de dichos grupos de β en animales superiores da cuenta de la gran diversidad estructural de las isoformas (β_1 , β_2 y β_3), dando paso a una tricotomía que engloba a las secuencias de los mamíferos incluidos.

En la sección inferior del árbol donde se disponen los grupos de animales originados tempranamente en la evolución, podemos observar que se incluye a *C. elegans* en la rama en la que también es posible encontrar diversos organismos del phylum *Arthropoda*; la arquitectura del mismo en dicha sección refleja que las proteínas reguladoras β son proteínas antiguas. Lo expuesto anteriormente permite suponer que en edades tempranas, las proteínas β se hallaban relativamente bien conservadas, sin presentar gran diversidad estructural aún en organismos poco relacionados evolutivamente.

M. brevicollis es un protista (*Choanoflagellata*), que de acuerdo a la topología del árbol filogenético es empleado como un intermediario entre los reinos eucariontes *Plantae*, *Fungi* y *Animalia*. Al observar dos grupos bien diferenciados en el centro del árbol que engloban, por una parte a secuencias de proteínas β de *Viridiplantae* con protistas y hongos, y por otra a los dominios GBD/SBD de las subunidades $\beta\gamma$ de *Viridiplantae* con las algas verdes *Prasinophyceae* y protistas como *P. tetraurelia*, *C. hominis*, *P. tricornutum* y *G. theta*, se puede inferir que las subunidades $\beta\gamma$ de plantas comparten un ancestro común con las subunidades $\beta\gamma$ de algas.

Además la secuencia de β de *T. gondii* (agrupada con las secuencias de proteínas $\beta\gamma$ de *O. lucimarinus* y *O. tauri* con un valor de Bootstrap de 820 en el nodo) indica que dicha subunidad β está emparentada evolutivamente con aquellas subunidades antiguas que dieron paso a la subunidad $\beta\gamma$, probablemente tras un evento de fusión de dominios con la subunidad γ . Ya que las subunidades $\beta\gamma$ de *Prasinophyceae* comparten un ancestro común con las subunidades de *Viridiplantae*, resulta probable que la fusión con la subunidad γ ancestral se presentara durante el periodo de radiación de las algas y de manera previa a la diversificación de las plantas y las algas verdes.

Si bien *Toxoplasma gondii* no está emparentada de forma cercana con las algas verdes, el hecho de que la secuencia de la subunidad β de dicho organismo se agrupara con las secuencias de proteínas $\beta\gamma$ de *O. lucimarinus* y *O. tauri* probablemente se deriva de que en el alineamiento no se incluyeron las secuencia de organismos que, en términos evolutivos, indicaran abiertamente la relación de parentesco entre las algas y los protistas.

Al observar el otro grupo establecido, en el que únicamente se agruparon secuencias de proteínas β de plantas con algunos protistas como *T. cruzi*, *G. lambia* y *M. pusilla* (además de una subunidad β de *O. lucimarinus*), podemos afirmar que dicho conjunto de protistas y plantas comparten como ancestro común a otro tipo de β ancestral que no se fusionó con la subunidad γ . Se puede apreciar que las secuencias de subunidades β de hongos incluidos en el alineamiento también se dispusieron en esta rama, en conjunto con las proteínas β de *Viridiplantae*, indicando poca diversificación entre las mismas en ambos reinos en tiempo evolutivo.

También se debe comentar que no es posible apreciar ninguna proteína β de plantas en el grupo en el que se incluyen las secuencias GBD/SBD de $\beta\gamma$; la β ancestral fusionada probablemente fue suprimida durante la evolución, seleccionándose únicamente el dominio de β incluido en la subunidad atípica $\beta\gamma$. De igual forma, suponemos que las subunidades $\beta\gamma$ se originaron posteriormente a la divergencia de los eucariontes ya que durante la búsqueda BLAST no se encontraron secuencias de animales y hongos que presentaran la estructura de dominios característica de la subunidad atípica.

Los análisis filogenéticos realizados previamente sobre el origen evolutivo de las proteínas AKIN $\beta\gamma$ se centraron en el dominio KIS (Kinase Interacting Sequences) de ésta subunidad, los resultados indican que las plantas poseen dos clases divergentes de secuencias KIS, una presente exclusivamente en las subunidades reguladoras β combinada con el dominio ASC y la otra fusionada con los motivos CBS de la subunidades γ característico de las subunidades $\beta\gamma$ [69]. Consistentemente con lo anterior, a partir de nuestros resultados podemos afirmar que en las plantas también se conocen dos dominios GBD/SBD divergentes, uno presente en las subunidades no fusionadas y el otro en la subunidad $\beta\gamma$.

El árbol filogenético NJ relativo a las subunidades γ (Fig. 54) narra una historia evolutiva similar a la de las subunidades β . En mamíferos nuevamente es posible apreciar una tricotomía, originada por la variedad de isoformas (γ_1 , γ_2 y γ_3) y diversidad en la estructura de dominios de la subunidades γ incluidas en el alineamiento. El nematodo *C. elegans* es empleado de nueva cuenta, como un intermediario entre los animales y las ramas centrales del árbol en las cuales se agrupa a las secuencias de subunidades γ de *Viridiplantae* con hongos y al protista *D. discoideum* y al alga *O. lucimarinus* (considerados como organismos surgidos tempranamente) con los dominios Bateman de las subunidades $\beta\gamma$ de *Viridiplantae*. La subunidad γ del protista incluido, así como la del organismo *Prasinophyceae*, permiten suponer también que la subunidad γ ancestral que dio paso a la subunidad $\beta\gamma$ por eventos de fusión está relacionada evolutivamente con las subunidades de algunos protistas y algas actuales, pero no con las subunidades γ (no fusionadas) en plantas.

A pesar de que el valor de Bootstrap que sustenta a las ramas en las que se agrupa a las subunidades γ de hongos con las γ de *Viridiplantae* es bajo (164), es consistente con el árbol NJ de las subunidades β . La relativa conservación de las subunidades reguladoras entre *Fungi* y *Plantae*, puede dar cuenta de un parecido a nivel estructural e incluso fisiológico, debido a que estos reinos se someten frecuentemente a condiciones de estrés similares.

Como se dijo antes, ya que los dos árboles NJ narran la misma historia evolutiva también las subunidades γ que dieron paso a las subunidades $\beta\gamma$ se ubican en organismos antiguos, pero no en *Viridiplantae*, indicando que tempranamente existían dos tipos de subunidades γ , uno de los cuales se fusionó con las subunidades β dando paso a la proteína atípica $\beta\gamma$, mientras que el otro grupo siguió un camino evolutivo diferente, hasta adquirir un alto grado de divergencia en los reinos eucariontes. Resulta de gran relevancia que los árboles NJ generados para cada subunidad reguladora, permitan inferir historias evolutivas similares, pues lo anterior se considera como un indicativo probable de que dos proteínas interactúan entre sí o forman parte de un mismo complejo.

Se sabe que la subunidad de plantas AKIN γ presenta una identidad marginal con las subunidades AMPK γ_1 y SNF4, además, evidencias experimentales demuestran que es incapaz de complementar a la mutante *Snf4* de levadura, por lo que se ha sugerido que ésta es un ortólogo distante de las subunidades γ de mamíferos y levaduras [70].



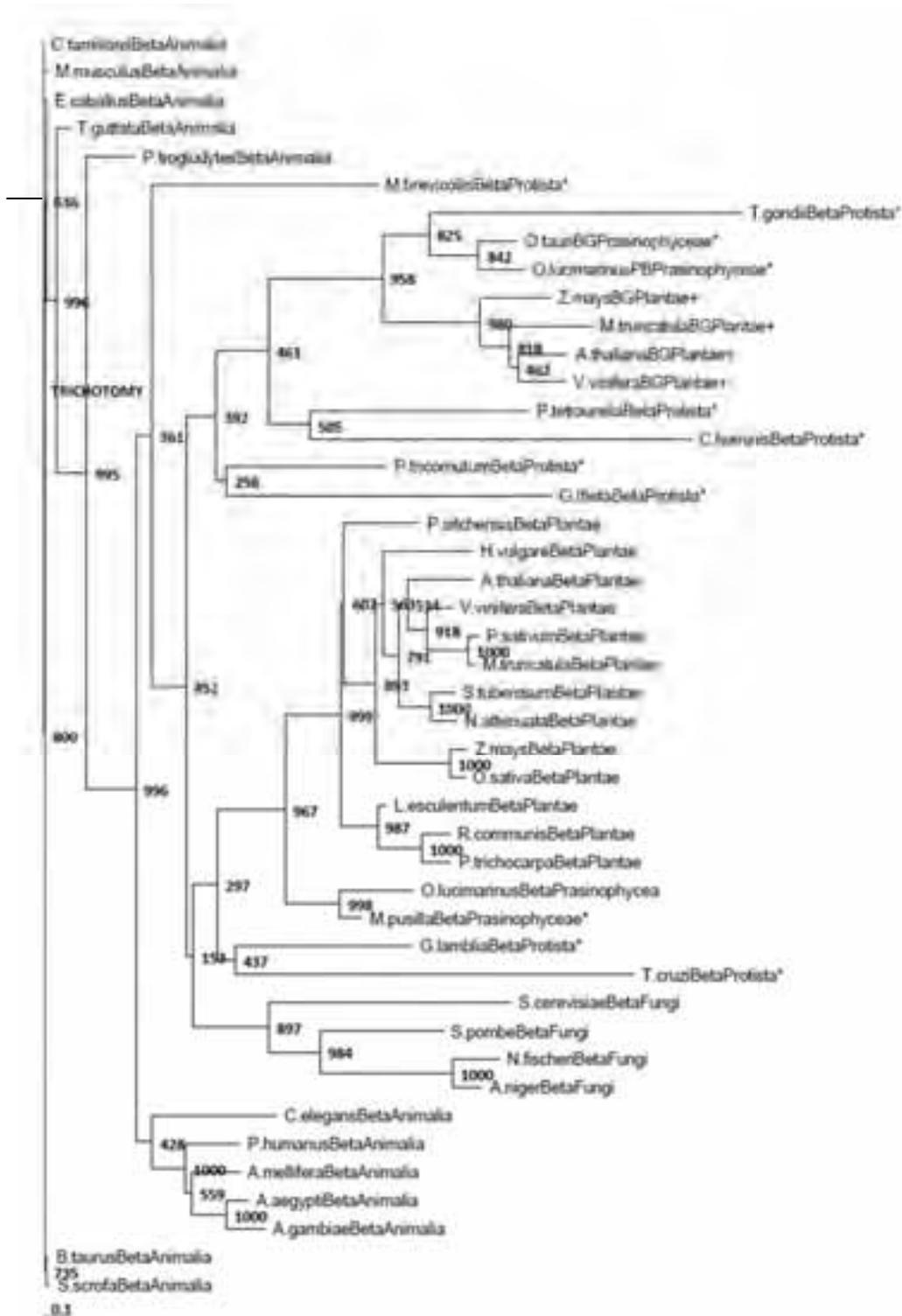


Fig.53. Árbol filogenético en el que se incluyen las secuencias relativas a las subunidades β de *Viridiplantae*, *Animalia*, *Fungi* y *Protista* y los dominios GBD/SBD de la subunidad atípica $\beta\gamma$. Los números dispuestos en los nodos representan los valores de Bootstrap.

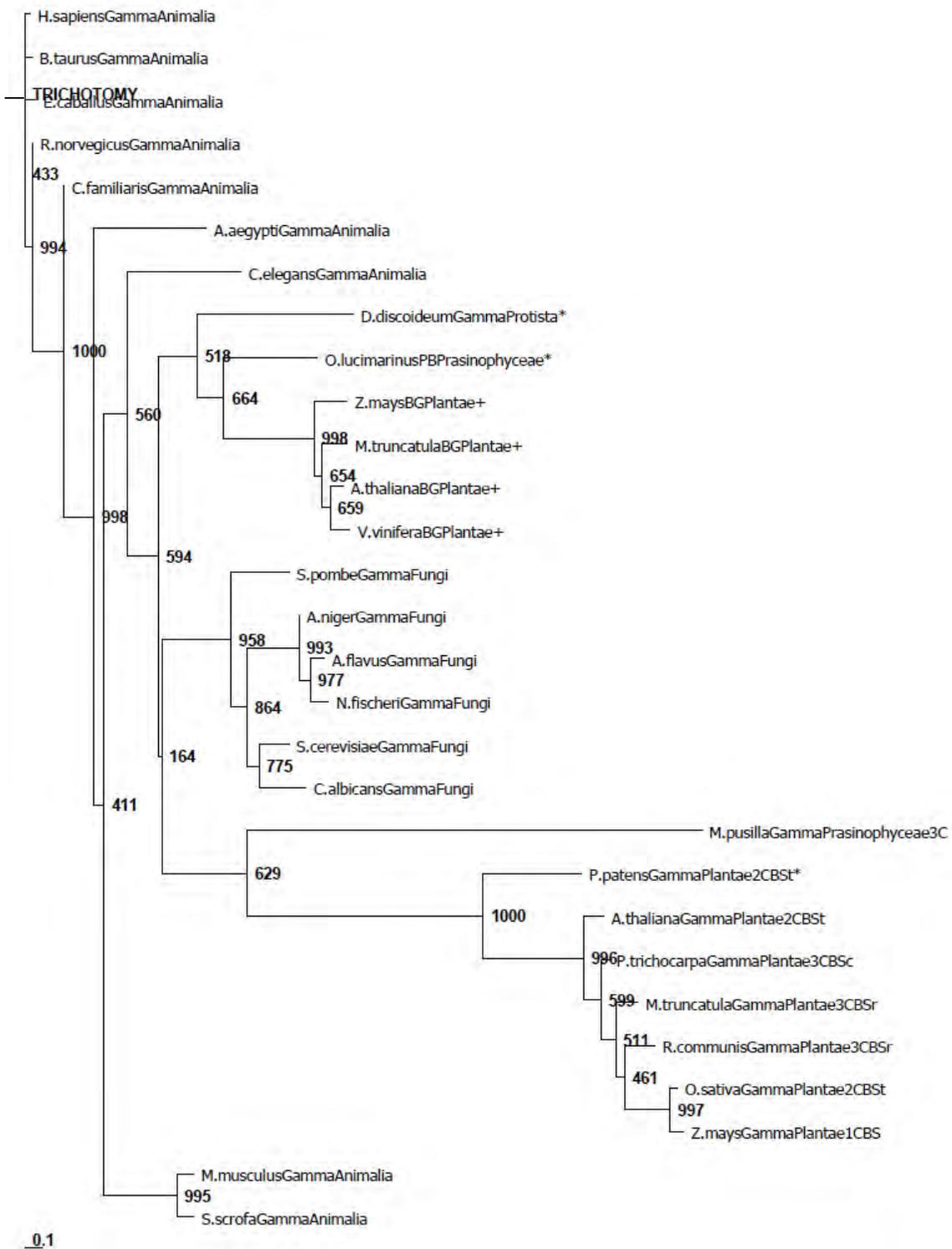


Fig.54. Árbol filogenético NJ en el que se incluyen las secuencias relativas a las subunidades γ de *Viridiplantae*, *Animalia*, *Fungi* y *Protista* y los motivos CBS cortados en dominios Bateman de la subunidad atípica $\beta\gamma$. Los números dispuestos en los nodos representan los valores de Bootstrap.

Conclusiones

- De acuerdo a los resultados de inmunocitoquímica e inmunolocalización, podemos concluir que, en condiciones de suficiencia de fósforo, es probable que la subunidad AKIN γ forme parte del heterotrímero SnRK1, ya que colocaliza con las subunidades catalíticas AKIN10 y AKIN11 en cloroplastos y citoplasma. Además, al no presentar una secuencia de localización cloroplástica, también es factible que AKIN γ sea transportada hacia el organelo, siendo las subunidades β ó $\beta\gamma$, las proteínas que podrían realizar dicha función.
- Las variaciones observadas en la fluorescencia intrínseca de la subunidad AKIN γ frente a la adición de adenosin 5'-monofosfato, indican que la unión del nucleótido a la proteína probablemente tiene un significado de relevancia fisiológica, no obstante, el estudio no es concluyente con respecto a la existencia de uno o más sitios de unión.
- A partir del análisis efectuado sobre la estructura cristalográfica de la subunidad AMPK γ_1 y el modelo tridimensional de AKIN γ , generado en el presente trabajo, podemos concluir que existen diferencias estructurales importantes en la subunidad reguladora de plantas, particularmente en los sitios putativos de unión al ligando.
- El dominio GBD/SBD de la subunidad $\beta\gamma$ es homólogo al de las subunidades β no fusionadas de *Viridiplantae*, protistas y algas, por lo tanto, posiblemente descienden de una proteína β ancestral. El segmento γ de la subunidad atípica $\beta\gamma$ es ortólogo a las subunidades γ de *Viridiplantae*, por lo que se propone que estas descienden de proteínas ancestrales γ relacionadas evolutivamente entre sí.
- Es posible que la fusión de dominios se llevara a cabo después de la divergencia de los eucariontes, probablemente durante el periodo anterior a la diversificación entre algas verdes y plantas.

- Los árboles filogenéticos NJ presentados, indican que las subunidades β y γ poseen la misma historia evolutiva, presumiblemente debido a que dichas proteínas interactúan entre sí al regular a los complejos heterotriméricos AMPK/SNF1/SnRK1.

Perspectiva

Debe considerarse prioritario efectuar ensayos que permitan determinar si la degradación de la subunidad AKIN γ es específica, ya que de serlo, esto implicaría que el estrés nutrimental por deficiencia de fósforo, induce la formación de un complejo heterotrimérico activo en el que presumiblemente esta proteína no se encuentra presente.

Referencias

1. Schachtman, D.P., R.J. Reid, and S.M. Ayling, *Phosphorus uptake by plants: From soil to cell*. Plant Physiology, 1998. **116**(2): p. 447-453.
2. Polge, C. and M. Thomas, *SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control?* Trends in Plant Science, 2007. **12**(1): p. 20-28.
3. Baena-González, E. and J. Sheen, *Convergent energy and stress signaling*. Trends in Plant Science, 2008. **13**(9): p. 474-482.
4. Karthikeyan, A.S., et al., *Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in Arabidopsis*. Planta, 2007. **225**(4): p. 907-918.
5. Raghothama, K., *Phosphate transport and signaling*. Current Opinion in Plant Biology, 2000. **3**(3): p. 182-187.
6. Holford, I.C.R., *Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants* Australian Journal of Soil Research, 1997. **35**(2): p. 227-240.
7. Raghothama, K.G. and A.S. Karthikeyan, *Phosphate acquisition*. Plant and Soil, 2005. **274**(1): p. 37-49.
8. Rengel, Z. and P. Marschner, *Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences*. New Phytol, 2005. **168**(2): p. 305-312.
9. Franco-Zorrilla, J.M., et al., *The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation*. Journal of Experimental Botany, 2004. **55**(396): p. 285-293.
10. López-Bucio, J., et al., *Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system*. Plant Physiology, 2002. **129**(1): p. 244-256.
11. Rengel, Z., *Genetic control of root exudation*. Plant and Soil, 2002. **245**(1): p. 59 -70.
12. Plaxton, W.C., *Essay 11.1: Metabolic Flexibility Helps Plants to Survive Stress*, in *Plant Physiology, Fourth Edition Online*, 2006.
13. Bernal, L., P. Coello, and E. Martínez-Barajas, *Possible role played by R1 protein in starch accumulation in bean (Phaseolus vulgaris) seedlings under phosphate deficiency*. Journal of Plant Physiology, 2005. **162**(9): p. 970-976.
14. Ciereszko, I., et al., *Interactive effects of phosphate deficiency, sucrose and light/dark conditions on gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in Arabidopsis*. Plant Physiology, 2005. **162**(3): p. 343-353.
15. Rao and Terry, *Leaf Phosphate Status, Photosynthesis, and Carbon Partitioning in Sugar Beet (IV. Changes with Time Following Increased Supply of Phosphate to Low-Phosphate Plants)*. Plant Physiology, 1995. **107**(4): p. 1313-1321.

16. Essigmann, B., et al., *Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1998. **95**(4): p. 1950–1955.
17. Kobayashi, K., et al., *Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk*. Plant J, 2006. **47**(2): p. 238 - 248.
18. Wu, P., et al., *Phosphate Starvation Triggers Distinct Alterations of Genome Expression in Arabidopsis Roots and Leaves*. Plant Physiology, 2003. **132**(3): p. 1260-1271.
19. Misson, J., et al., *A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2005. **102**(33): p. 11934-11939.
20. Camacho, Y., et al., *Characterization of a type A response regulator in the common bean (Phaseolus vulgaris) in response to phosphate starvation*. . Physiologia Plantarum, 2008. **132**(3): p. 272-282.
21. Stone, J.M. and J.C. Walker, *Plant Protein Kinase Families and Signal Transduction*. Plant Physiology, 1995. **108**(2): p. 451-457.
22. Hrabak, E.M., et al., *The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases*. Plant Physiology, 2003. **132**(2): p. 666-680.
23. Hardie, D.G., *AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**(10): p. 774-785.
24. Hardie, D.G., S.A. Hawley, and J.W. Scott, *AMP-activated protein kinase – development of the energy sensor concept*. Journal of Physiology, 2006. **574**(1): p. 7-15.
25. Pierre, M., et al., *N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in Arabidopsis*. Plant Cell, 2007. **19**(7): p. 2804-2821.
26. Oakhill, J.S., J.W. Scott, and B.E. Kemp, *Structure and function of AMP-activated protein kinase*. Acta Physiologica (accepted article), 2008. DOI: [10.1111/j.1748-1716.2009.01977.x](https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01977.x).
27. Rolland, F., E. Baena-González, and J. Sheen, *Sugar Sensing and Signaling in Plants: Conserved and Novel Mechanisms*. Annual Review of Plant Biology, 2006. **57**(1): p. 675-709.
28. Halford, N., et al., *Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase*. Journal of Experimental Botany, 2003. **54**(382): p. 467-475.
29. Kolbe, A., et al., *Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2005. **102**(31): p. 11118–11123.
30. Laurie, S., R.S. McKibbin, and N. Halford, *Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an alpha-amylase (alpha-Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos*. Journal of Experimental Botany, 2003. **54**(383): p. 739-747.

31. Lovas, Á., et al., *Functional diversity of potato SNF1-related kinases tested in Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 2003. **321**(1): p. 123-129.
32. Schwachtje, J., et al., *SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2006. **103**(34): p. 12935-12940.
33. Hardie, D.G., *AMPK and SNF1: Snuffing Out Stress*. Cell Metabolism, 2007. **6**(5): p. 339-340.
34. Baena-González, E., et al., *A central integration of transcription networks in plant stress and energy signaling*. Nature, 2007. **448**(7156): p. 938-942.
35. Crute, B.E., et al., *Functional domains of the α_1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(52): p. 35347-35354.
36. Frago, S., et al., *SnRK1 Isoforms AKIN10 and AKIN11 Are Differentially Regulated in Arabidopsis Plants under Phosphate Starvation*. Plant Physiology, 2009. **149**(4): p. 1906-1916.
37. Iseli, T.J., et al., *AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence* Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(14): p. 13395-13400.
38. Gissot, L., et al., *AKINb3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic beta-subunits*. Plant Molecular Biology, 2004. **56**(5): p. 747-759.
39. Slocombe, S.P., et al., *Identification of SnIP1, a novel protein that interacts with SNF1-related protein kinase (SnRK1)* Plant Molecular Biology, 2002. **49**(1): p. 31-44.
40. Halford, N., et al., *Dissection and manipulation of metabolic signalling pathways*. Annals of Applied Biology, 2003. **142**(1): p. 25-31.
41. Kemp, B.E., et al., *AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator*. Biochemical Society Transactions, 2003. **31**(1): p. 162-168.
42. Kemp, B.E., *Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract*. The Journal of Clinical Investigation, 2004. **113**(2): p. 182-184.
43. Xiao, B., et al., *Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase*. Nature, 2007. **449**(7161): p. 496-501.
44. Hardie, D.G., *AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy*. Nature Reviews Molecular Cell Biology (Advance On line Publications), 2007. DOI: **10.1038/nrm2249**.
45. Arad, M., et al., *Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy*. J Clin Invest, 2002. **109**(3): p. 357 - 362.
46. Daniel, T. and D. Carling, *Functional analysis of mutations in the γ_2 subunit of AMP-activated protein kinase associated with cardiac hypertrophy and Wolff-Parkinson-White syndrome*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(52): p. 51017-51024.

47. Adams, J., et al., *Intrasteric control of AMPK via the γ_1 subunit AMP allosteric regulatory site*. Protein Science, 2004. **13**(1): p. 155-165.
48. Milan, D., et al., *A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle*. Science, 2000. **288**(5469): p. 1248-1251.
49. Kleinow, T., et al., *Functional identification of an Arabidopsis SnF4 ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of snf4 deficiency in yeast*. Plant Journal, 2000. **23**(1): p. 115-122.
50. Gissot, L., et al., *AKIN $\beta\gamma$ Contributes to SnRK1 Heterotrimeric Complexes and Interacts with Two Proteins Implicated in Plant Pathogen Resistance through Its KIS/GBD Sequence* Plant Physiology, 2006. **142**: p. 931-944.
51. Dyck, J.R.B., et al., *Regulation of 5'-AMP-activated Protein Kinase Activity by the Noncatalytic β and γ Subunits*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(30): p. 17798-17803.
52. Shen, W. and L. Hanley-Bowdoin, *Geminivirus Infection Up-Regulates the Expression of Two Arabidopsis Protein Kinases Related to Yeast SNF1- and Mammalian AMPK-Activating Kinases*. Plant Physiology, 2006. **142**(4): p. 1642-1655.
53. Hawley, S.E., et al., *5*-AMP Activates the AMP-activated Protein Kinase Cascade, and Ca21/Calmodulin Activates the Calmodulin-dependent Protein Kinase I Cascade, via Three Independent Mechanisms*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(45): p. 27186-27191.
54. Davies, S.P., et al., *5-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMPactivated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C and native bovine protein phosphatase-2AC*. FEBS Letters, 1995. **377**(3): p. 421-425.
55. Hardie, D.G., D. Carling, and M. Carlson, *The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?* Annual Review of Biochemistry, 1998. **67**(1): p. 821-855.
56. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy 3rd Edition*. 3th Edition ed. 2006: Springer. 954.
57. Teale, F., *The ultraviolet fluorescence of proteins in neutral solutions*. Biochem J, 1960. **76**(2): p. 381-388.
58. Charter, R.A., M.A. Tabatabai, and J.W. Schafer, *Arsenic, molybdenum, selenium, and tungsten contents of fertilizers and phosphate rocks*. Communications in soil science and plant analysis, 1995. **26**(17-18): p. 3051-3062.
59. Guttormsen, G., B.R. Singh, and A.S. Jeng, *Cadmium concentration in vegetable crops grown in a sandy soil as affected by Cd levels in fertilizer and soil pH* Fertilizer Research, 1995. **41**(1): p. 27-32.
60. Zimmerman, P., et al., *W. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox*. Plant Physiology, 2004. **136**(1): p. 2621-2632.

61. Farrás, R., et al., *SKP1–SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase*. The EMBO Journal, 2001. **20**(11): p. 2742-2756.
62. Lee, J.-H., et al., *Characterization of Arabidopsis and Rice DWD Proteins and Their Roles as Substrate Receptors for CUL4-RING E3 Ubiquitin Ligases*. The Plant Cell, 2008. **20**(1): p. 152-167.
63. Cooper, K.F., M.J. Mallory, and R. Strich, *Oxidative Stress-Induced Destruction of the Yeast C-Type Cyclin Ume3p Requires Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C and the 26S Proteasome*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(5): p. 3338-3348.
64. Radchuk, R., et al., *Repressing the expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN gene in pea embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype*. Plant Physiology, 2006. **140**(1): p. 263-278.
65. Hey, S., et al., *DNA sequences from Arabidopsis, which encode protein kinases and function as upstream regulators of Snf1 in yeast*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(14): p. 10472-10479.
66. Horton, P., et al., *WoLF PSORT: protein localization predictor*, in *Nucleic Acids Research*. 2007. p. W585-W587.
67. Guvench, O. and A.D. MacKerell, *Comparison of Protein Force Fields for Molecular Dynamics Simulations in Methods in Molecular Biology*, A. Kukol, Editor. 2008, Humana Press. p. 63-88.
68. Amodeo, G.A., M.J. Rudolph, and L. Tong, *Crystal structure of the heterotrimer core of Saccharomyces cerevisiae AMPK homologue SNF1*. Nature, 2007. **449**(7161): p. 492-496.
69. Lumberras, V., et al., *Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution*. EMBO Reports, 2001. **2**(1): p. 55-60.
70. Bouly, J.-P., et al., *Arabidopsis thaliana proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKIN α 1, an SNF1-like protein kinase*. The Plant Journal, 1999. **18**(5): p. 541-550.

Referencias adicionales

- 1) Bhattcharya, A. (2009). *Structures of desire*. Nature, **459**(7243): 24-27.
- 2) Carling, D., et al. (1994). *Mammalian AMP-activated Protein Kinases Homologous to Yeast and Plant Protein Kinases Involved in the Regulation of Carbon Metabolism*. The Journal of Biological Chemistry, **269**(15): 11442-11448.
- 3) Eddy, S. R. (1998). *Profile hidden Markov models*. Bioinformatics Review, **14**(9): 755-763.
- 4) Espíndola, L. (2009). *Expresión de la subunidad catalítica AKIN11 del complejo enzimático SnRK1 de Arabidopsis thaliana durante la deficiencia de fósforo*. Facultad de Química, Conjunto

- E., Ciudad de México, Universidad Nacional Autónoma de México, **Maestro en Ciencias Bioquímicas**: 63.
- 5) Halford, N., et al. (2002). *Crop Performance Annual Report 2001-2002*. IACR - Crop Performance Annual Report: 16-19.
 - 6) Hao, L., et al. (2003). *Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase*. *Plant Cell*, **15**(4): 1034-1048.
 - 7) Hardie, D. G. and K. Sakamoto (2006). *AMPK: A Key Sensor of Fuel and Energy Status in Skeletal Muscle*. *Physiology*, **21**(1): 48-60.
 - 8) Higgins, D. G., et al. (1992). *CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment*. *CABIOS*, **8**: 189-191.
 - 9) Higgins, D. G. and P. M. Sharp (1989). *Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer*. *CABIOS*, **5**: 151-153.
 - 10) Hinsinger, P. (2001). *Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review*. *Plant and Soil*, **237**(2): 173-195.
 - 11) Kannan, N., et al. (2007). *Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module*. *Genome Biology*, **8**(12): R264.
 - 12) Karplus, K. (2009). *SAM-T08, HMM-based protein structure prediction*. *Nucleic Acid Research Advance Access*, DOI:10.1093/nar/gkp403.
 - 13) Krogh, A., et al. (1994). *Hidden Markov models in computational biology: Applications to protein modeling*. *Journal of Molecular Biology*, **235**(5): 1501-1531.
 - 14) Liu, J., et al. (2000). *The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**(7): 3730-3734.
 - 15) Makarevich, G., et al. (2006). *Different Polycomb group complexes regulate common target genes in Arabidopsis*. *EMBO Reports* **7**(9): 947-952.
 - 16) Man, A. L., et al. (1997). *Potato SNF1-related protein kinase: molecular cloning, expression analysis and peptide kinase activity measurements*. *Plant Molecular Biology* **34**(1): 31-43.
 - 17) Page, R. D. M. and E. C. Holmes (1998). Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach. United Kingdom, Blackwell Science.
 - 18) Polekhina, G., et al. (2003). *AMPK β -subunit targets metabolic stress sensing to glycogen*. *Current Biology*, **13**(10): 867-871.
 - 19) Rubio, V., et al. (2001). *A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae*. *Genes & Development*, **15**(16): 2122-2133.

- 20) Sanders, M. J., et al. (2007). *Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade*. *Biochem Journal*, **403**(1): 139-148.
- 21) Scott, J. W., et al. (2007). *Regulation of AMP-activated protein kinase by a pseudosubstrate sequence on the c subunit*. *The EMBO Journal*, **26**(3): 806-815.
- 22) Shen, W., et al. (2009). *Arabidopsis Protein Kinases GRIK1 and GRIK2 Specifically Activate SnRK1 by Phosphorylating Its Activation Asa*. *Plant Physiology Preview*.
- 23) Thelander, M., et al. (2007). *The moss genes PpSKI1 and PpSKI2 encode nuclear SnRK1 interacting proteins with homologues in vascular plants*. *Plant Molecular Biology*, **64**(5): 559-573.
- 24) Thompson, et al. (1997). *The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. *Nucleic Acids Research*, **25**(24): 4876-4882.
- 25) Thompson, et al. (1994). *Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice*. *Nucleic Acids Research*, **22**(22): 4673-4680.
- 26) Van der Spoel, et al. (2005). Gromacs user manual version 4.0, www.gromacs.com.
- 27) Viana, et al. (2007). *A conserved sequence immediately N-terminal to the Bateman domains in AMP-activated protein kinase gamma subunits is required for the interaction with the beta subunits*. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**(22): 16117-16125.
- 28) Woods, et al. (1996). *Characterization of AMP-activated Protein Kinase β and γ Subunits Assembly of the heterotrimeric complex in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**(17): 10282-10290.