



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE FOSFORILACIÓN
DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN PHR1**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

JUAN PABLO SALAZAR SOSA



CIUDAD DE MÉXICO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA**

VOCAL: **Profesor: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI**

SECRETARIO: **Profesor: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO**

1er. SUPLENTE: **Profesor: AURORA LARA NÚÑEZ**

2° SUPLENTE: **Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Beatriz Alejandra Ávila Castañeda

SUSTENTANTE:

Juan Pablo Salazar Sosa

Índice general

Resumen	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Importancia del fósforo y estrés	8
1.2 Respuestas a la deficiencia de fosfato	10
1.3 Descubrimiento del factor de transcripción PHR1	12
1.3.1 PSR1 como precedente	13
1.4 Cascada de transducción de señales mediada por PHR1	14
1.5 Familia de las proteínas cinasas SnRK.....	16
1.5.1 Estructura de los complejos cinasa SNF1/AMPK/SnRK1	19
1.5.2 SnRK1 en la regulación de las PSR en plantas	20
2. ANTECEDENTES INMEDIATOS	21
2.1 Hipótesis.....	24
2.2 Objetivo general	24
2.2.1 Objetivos particulares	24
3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 Clonación de la construcción PHR1 en el vector de expresión pET28b	26
4.1.1 Diseño de los oligonucleótidos específicos para clonar PHR1 en el vector pET28b.....	26
4.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	26
4.1.3 Electroforesis en geles de agarosa para separar ácidos nucleicos	27
4.1.4 Purificación de DNA de geles de agarosa.....	27

4.1.5 Ligación del cDNA de PHR1 en el vector de clonación pGEM-T Easy.....	27
4.1.6 Transformación de células competentes <i>E. coli</i> DH5 α	27
4.1.7 Obtención y purificación del vector de expresión pET28b	28
4.1.8 Ligación del cDNA de PHR1 en el vector de expresión pET28b	28
4.2 Diseño de los oligonucleótidos específicos para clonar a los mutantes <i>Phr1-1</i> , <i>Phr1-2</i> y <i>Phr1-DM</i> en el vector pET28b	29
4.2.1 Transformación de células competentes <i>E. coli</i> BL21-RIL.....	29
4.3 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes PHR1 y mutantes por el método de desnaturalización y renaturalización en columna.....	30
4.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico (SDS- PAGE)	31
4.3.2 Microdiálisis.....	32
4.3.3 Cuantificación de proteína por el Método Colorimétrico de Bradford.....	32
4.3.4 Western blot	33
4.4 Expresión y purificación de la proteína SnRK2.6	34
4.5 Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	34
5. RESULTADOS	36
5.1 Reacción en cadena de la polimerasa de PHR1.....	36
5.2 Ligación del cDNA de <i>PHR1</i> en el vector de clonación pGEM-T Easy.....	36
5.3 Incorporación de <i>PHR1</i> al vector de expresión pET28b	37
5.4 Obtención de mutantes <i>Phr1-1</i> , <i>Phr1-2</i> y <i>Phr1-DM</i>	38
5.4.1 Incorporación de <i>Phr1-1</i> en el vector de expresión pET28b.....	38
5.4.2 Incorporación de <i>Phr1-2</i> en el vector de expresión pET28b.....	39
5.4.3 Incorporación de <i>Phr1-DM</i> en el vector de expresión pET28b	41

5.5 Obtención de las proteínas PHR1 y mutantes	42
5.5.1 Sobreexpresión de la proteína recombinante PHR1	42
5.5.2 Purificación de la proteína recombinante PHR1 por el método de desnaturalización y renaturalización en columna.....	44
5.6 Obtención de la proteína recombinante SnRK2.6	46
5.7 Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i>	47
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
6.1 Conclusiones	55
6.2 Perspectivas	55
Bibliografía	56
Anexo I: Estrategia de mutagénesis	63
Anexo II: Secuencia de las construcciones PHR1 y mutantes	66

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Adquisición y transporte de Pi a la planta.....	10
Figura 2. Fenotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> en deficiencia de fosfato.....	11
Figura 3. Cascada de transducción de señales mediada por PHR1	15
Figura 4. Diagrama de secuencias de la familia AMPK/SNF1/SnRK	17
Figura 5. La SnRK1 como regulador energético global de la planta	18
Figura 6. Composición del complejo heterotrimérico AMPK/SNF1/SnRK de diferentes organismos	19
Figura 7. Actividad de SnRK de fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular de un extracto proteico de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i> crecidas en suficiencia y deficiencia de fósforo	22
Figura 8. Proteínas fosforiladas por un extracto parcialmente purificado de SnRK1 obtenido a partir de plántulas crecidas en suficiencia y deficiencia de Pi	23
Figura 9. Sitios de fosforilación de la PHR1	23
Figura 10. Amplificación del cDNA de <i>PHR1</i>	36
Figura 11. Digestión de pGEM-T Easy- <i>PHR1</i>	37
Figura 12. Purificación de pET28b.....	37
Figura 13. Digestión con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> de la construcción pET28b- <i>PHR1</i>	38
Figura 14. Digestión con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> de la construcción pET28b- <i>Phr1-1</i>	39
Figura 15. Amplificación de dos fragmentos de diferente extensión	39
Figura 16. Amplificación del cDNA de <i>Phr1-2</i>	40
Figura 17. Digestión con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> de la construcción pET28b- <i>Phr1-2</i>	41
Figura 18. Digestión con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> de la construcción pET28b- <i>Phr1-DM</i>	42

Figura 19. Sobreexpresión de la proteína PHR1	43
Figura 20. Purificación de la proteína PHR1.....	44
Figura 21. Obtención de las proteínas purificadas PHR1 y mutantes	45
Figura 22. Western blot de las proteínas PHR1 y mutantes.....	45
Figura 23. Purificación de la proteína SnRK2.6.....	46
Figura 24. Fosforilación <i>in vitro</i> de PHR1	48
Figura 25. Ensayos de fosforilación sobre PHR1 con la proteína recombinante SnRK2.6	49
Figura 26. Estrategia de mutagénesis llevada a cabo para obtener el cDNA de <i>Phr1-1</i>	63
Figura 27. Amplificación de dos fragmentos de diferente extensión	64
Figura 28. Estrategia de mutagénesis llevada a cabo para obtener el cDNA de <i>Phr1-2</i>	64
Figura 29. Estrategia de mutagénesis llevada a cabo para obtener el cDNA de <i>Phr1-DM</i>	65
Tabla 1. Temperaturas de crecimiento y concentraciones de inductor IPTG probadas para establecer la mejor sobreexpresión de las proteínas recombinantes	30
Tabla 2. Volúmenes empleados de BSA para la construcción de la curva de calibración.....	32

Resumen

La habilidad de las plantas para tolerar factores de estrés (ataque de herbívoros, patógenos y otros factores abióticos, como el estrés por frío, calor, choque osmótico o estrés nutricional) es determinante para un buen desarrollo de la planta. El fósforo es un elemento esencial que requieren las plantas para un óptimo crecimiento. Las concentraciones de fósforo en el suelo son altas, pero su forma asimilable, el fosfato inorgánico (Pi) se encuentra limitante, por lo que las plantas suelen pasar por periodos de deficiencia de Pi. Es por ello que han desarrollado respuestas para compensar esta deficiencia. Un gen regulador de la respuesta a estrés por Pi que funciona como un factor de transcripción, es Phosphate Starvation Response 1 (PHR1). Así, PHR1 estimula la expresión de genes que responden a la deficiencia de fosfato, entre ellos transportadores de fosfato, RNAsas, fosfatasas y microRNA's. La regulación de PHR1 ha sido poco estudiada, pero se sabe que el gen no modifica su expresión en condiciones de deficiencia nutricional, por lo que se propone que un mecanismo post-traducciona l está regulando su actividad. Datos obtenidos en nuestro laboratorio, indican que PHR1 es fosforilada por la cinasa Sucrose non-fermenting Related Kinase 1 (SnRK1). Se ha observado que durante la deficiencia de Pi, existen cambios en la actividad de cinasa de la SnRK1 de *Arabidopsis thaliana*, y una regulación diferencial de sus isoformas en deficiencia y suficiencia de fosfato. Lo anterior indica que es posible que la SnRK1 esté involucrada en repuestas ante este tipo de estrés nutricional, sobre todo en aquellas que modulan la adaptación metabólica. Considerando la secuencia consenso que reconoce la SnRK1 en sus sustratos, se encontró que PHR1 presenta dos sitios potenciales de fosforilación. Mediante mutagénesis dirigida se obtuvieron las proteínas recombinantes con la mutación puntual en la S11A y en la S304A, así como la proteína PHR1 con las dos mutaciones. Ensayos de fosforilación realizados, revelaron que utilizando un extracto parcialmente puro de SnRK1, las mutantes S11A y S304A son fosforiladas y la doble mutante no presenta fosforilación, sugiriendo que ambos sitios son reconocidos por la cinasa. Interesantemente, cinasas de la subfamilia SnRK2 no reconocen a PHR1 como sustrato y sólo la SnRK1 es capaz de fosforilarla.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del fósforo y estrés

Como cualquier otro organismo vivo, las plantas responden a variaciones de las condiciones ambientales y de la disponibilidad de sus nutrientes; al ser organismos sésiles, presentan respuestas que son ejecutadas mediante la integración de señales que determinan su crecimiento y desarrollo (Smith y Stitt, 2007). Como producto de esta respuesta, las plantas han desarrollado la capacidad para adaptarse a periodos largos de estrés a través de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos para adecuarse a condiciones extremas (Baena-González *et al.*, 2007; Smith y Stitt, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Uno de los principales factores que provoca cambios sustanciales en el crecimiento y desarrollo de las plantas, es la disponibilidad de nutrientes. Las plantas necesitan de 17 macronutrientes esenciales, dentro de los cuales el fósforo (P), junto con el nitrógeno (N) y potasio (K), limitan en gran medida su crecimiento (Fragoso *et al.*, 2009; Plaxton y Tran, 2011).

La importancia del P radica en que es un componente estructural de las membranas celulares formando parte de los fosfolípidos que conforman la bicapa lipídica, es el sustrato para la formación de la molécula energética celular, que es el ATP y también es constituyente de los ácidos nucleicos. Además, es necesario en la división celular, en la formación de almidón y azúcar, en la germinación de semillas, floración y formación del fruto, entre otras funciones. A un nivel bioquímico, diversas enzimas y proteínas regulan su función y localización dependiendo de su estado de fosforilación (Panigrahy *et al.*, 2009).

A pesar de que el fósforo es un elemento abundante en el suelo, su forma asimilable, el ión ortofosfato, H_2PO_4^- (Pi), está poco disponible para su absorción por la planta y como consecuencia estos organismos han desarrollado una serie de respuestas a la deficiencia de este nutriente (PSR, Pi-starvation response) (Fragoso *et al.*, 2009; Yuan y Dong, 2008).

El Pi es transportado dentro de la planta a través de numerosas membranas y organelos por medio de transportadores específicos que cotransportan Pi y H⁺ (Marschner, 1995). El Pi pasa por los diferentes tejidos que componen la raíz hasta llegar al xilema, para de ahí ser transportado hacia la parte aérea, donde es liberado a los tejidos fotosintéticos (Figura 1). Se han identificado transportadores involucrados en la movilización de Pi hacia el interior de las células y entre diferentes organelos, los cuales se clasifican en cuatro familias. La familia PHT1 efectúa la toma de Pi a través de la membrana plasmática, a éstos pertenecen Pht1;1 al Pht1;9 (Shin *et al.*, 2004). Los correspondientes a la familia PHT2 se localizan en la membrana interna de plastidios y uno de sus miembros, Pht2;1 se expresa en tejido verde y es considerado un transportador de baja afinidad implicado en la relocalización de Pi entre la parte aérea y la raíz y en la translocación de Pi dentro de la hoja (Versaw y Harrison, 2002). Los PHT3 son transportadores de Pi que se localizan en la membrana interna mitocondrial (Poirier y Bucher, 2002). La familia PHT4 está implicada en el transporte de Pi entre el citosol, el cloroplasto, y el aparato de Golgi (Guo *et al.*, 2008). Los Pht1;1 y Pht1;4 son dos transportadores de alta afinidad en *Arabidopsis* que contribuyen a la adquisición del Pi del suelo al interior de la planta, tanto en condiciones normales como durante la deficiencia de Pi (Shin *et al.*, 2004).

Una proteína relevante en la carga de Pi al xilema desde la raíz es llamada PHO1. Los mutantes en el gen *pho1* presentan una reducción de Pi en hojas mientras que las concentraciones en la raíz son normales; esto ocasiona que la planta presente síntomas de deficiencia de Pi, que abarcan la disminución de crecimiento del tallo y parte aérea de la planta, hojas pequeñas y acumulación de antocianinas. La proteína correspondiente a PHO1 contiene 6 dominios transmembranales y un dominio N-terminal hidrofílico. No presenta homología con transportadores de Pi conocidos, pero contiene dos dominios denominados SPX y EXS, que se han identificado en proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* involucrados en el transporte y/o detección de Pi (Wang *et al.*, 2004; Stefanovik *et al.*, 2011).

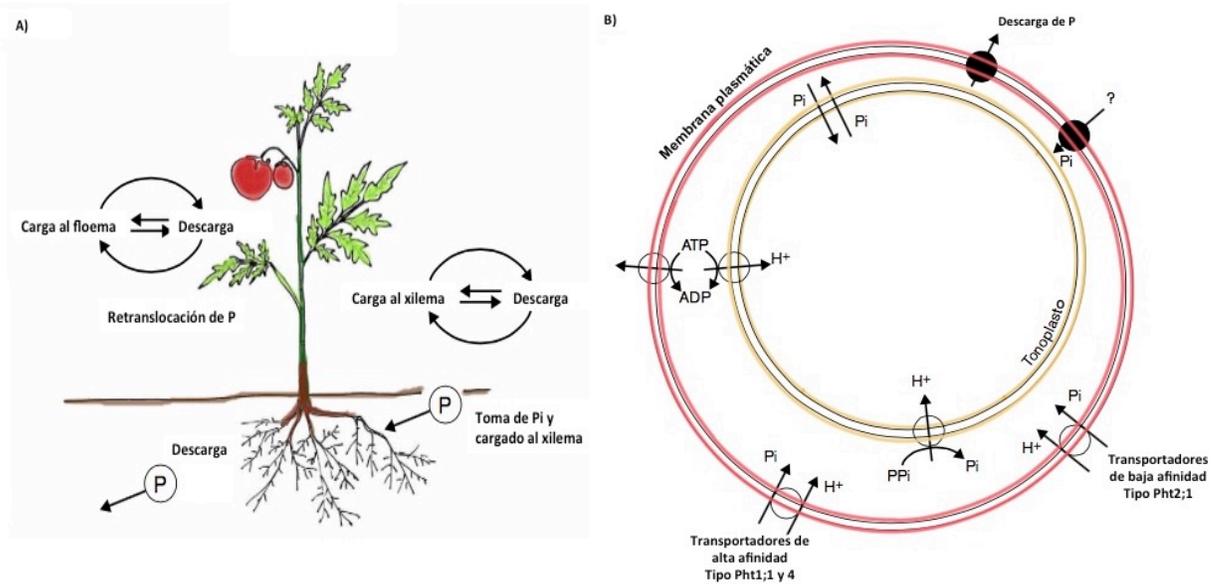


Figura 1. Adquisición y transporte de Pi a la planta. A) Las plantas captan el fosfato por las raíces, a través de transportadores de alta afinidad, y es cargado al xilema para ser transportado y descargado en órganos blanco; diversos tipos de translocadores y transportadores están involucrados en el proceso. Existe recambio de Pi entre los tejidos de la planta y el Pi es transportado principalmente por el floema. B) Esquema que ejemplifica la ubicación de los diferentes transportadores de alta y baja afinidad, así como translocadores de Pi que permiten el transporte y almacenamiento de Pi. La fuerza que permite el movimiento de Pi hacia dentro y fuera del organismo está dado por bombas de protones en la membrana plasmática y por pirofosfatasas y bombas de protones en el tonoplasto (Modificado de Raghothama, 2000).

Si la concentración de Pi no es limitante, las plantas deben eliminar el Pi que no necesitan para evitar su toxicidad, esto lo realizan mediante canales iónicos de Pi que se encuentran en la membrana plasmática de la raíz regulando la homeostasis celular (Raghothama, 2005).

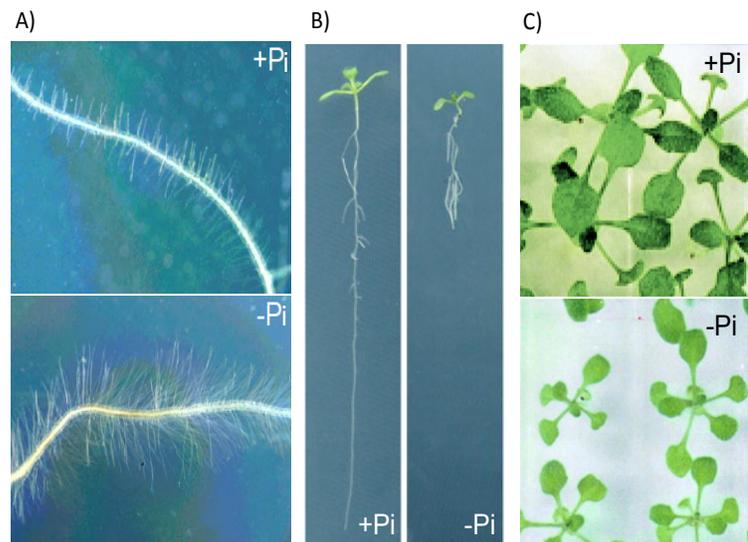
1.2 Respuestas a la deficiencia de fosfato

Para que existan cambios morfológicos y bioquímicos que le permitan a las plantas adaptarse a una carencia de fosfato, se necesita reprogramar la expresión génica y controlar la actividad y localización de proteínas y enzimas con la función de aumentar la cantidad de fósforo biodisponible, optimizar el uso de Pi interno y fomentar la búsqueda de Pi (Plaxton y Tran, 2011). La modificación de la arquitectura radicular es una de las PSR que se ha observado responde a cambios finos de disponibilidad de Pi en el suelo. Estas modificaciones consisten en que la raíz primaria detiene su

crecimiento y se favorece la aparición de raíces laterales y de pelos radiculares, lo cuál ayuda a la planta a explorar las regiones en la rizósfera en donde es más abundante el Pi (Figura 2). Adicionalmente, las plantas secretan ácidos orgánicos (malato, citrato y carboxilato) para liberar el fósforo que se encuentra quelado con metales como el calcio, hierro y aluminio, con la finalidad de aumentar la disponibilidad de Pi asimilable. Además, se secretan ribonucleasas, fosfatasa ácidas (ACP) y fosfodiesterasas para liberar el Pi de la materia orgánica presente en la rizósfera (Yuan y Dong, 2008; Panigrahy *et al.*, 2009).

Metabólicamente, también existen modificaciones importantes para hacer frente a un estrés nutrimental; una de ellas, es la utilización de pirofosfato (PPi), como un donador de energía. El PPi es un subproducto de reacciones anabólicas que se acumulan en el citoplasma de células vegetales por lo que sus niveles se mantienen en una concentración constante de 0.5 mM, debido a que su hidrólisis es baja (Stitt, 1998). En condiciones de estrés, el PPi es producido a velocidades muy bajas durante la síntesis de moléculas esenciales, tales como proteínas, ácidos nucleicos y membranas, necesarias para resistir un crecimiento disminuido o para reemplazar aquellas que puedan comenzar a dañarse. Las plantas tienen enzimas que utilizan el PPi para incrementar la eficiencia energética de diversos procesos celulares, así las enzimas dependientes de ATP pueden ser sustituidas por otras que utilizan PPi (Vance *et al.*, 2003).

Figura 2. Fenotipos de *Arabidopsis thaliana* en deficiencia de fosfato. La alteración más evidente en la planta es la modificación de la arquitectura radicular. A) Se observa un incremento en el número de pelos radiculares, B) disminución de la raíz primaria y aumento en el número de raíces laterales, con el fin de tomar Pi del medio donde éste es más abundante. C) La disminución en el crecimiento de la parte aérea en plántulas es otra PSR característica observada.



La reutilización de fosfato interno, es otro camino que las plantas siguen para mantener su homeostasis de Pi. La planta es capaz de movilizar el fosfato almacenado en biomoléculas como fosfolípidos y ácidos nucleicos. Los fosfolípidos son una reserva extensa de Pi en la planta y durante una deficiencia de fosfato, existe conversión en las membranas plasmáticas por otros lípidos que no contengan fosfato como grupo polar, como lo son los galactolípidos y sulfolípidos (Andersson *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2006).

1.3 Descubrimiento del factor de transcripción PHR1

La mayoría de las PSR que se activan en la planta involucran cambios en los patrones de expresión de cientos de genes conocidos como Phosphate Starvation Inducible (PSI). Se ha demostrado que todos estos cambios en los perfiles de expresión génica son mediados por factores transcripcionales (FT). Un ejemplo es bHLH32, que está implicado en procesos de producción de antocianinas, acumulación de Pi endógeno y formación de pelos radiculares, típicos de la respuesta a un déficit de Pi. Además, en presencia de fosfato regula negativamente a la fosfoenol piruvato carboxilasa cinasa 1 (PPCK1) y PPCK2, que regulan a su vez a la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) (Chen *et al.*, 2007), enzima citosólica ubicua en plantas que cataliza la β -carboxilación del fosfoenol piruvato (PEP, phosphoenolpyruvate) en presencia de HCO_3^- para dar como productos oxalacetato y Pi. El FT WRKY75 se induce en condiciones de deficiencia de Pi y regula positivamente la respuesta a este estrés nutrimental al promover la expresión de otros genes. Los mutantes correspondientes producidos por RNA interferente (RNAi) presentan acumulación de antocianinas en respuesta a la deficiencia de Pi, además de que se encontró que el FT WRKY75 actúa también en respuesta a infecciones por patógenos (Dong *et al.*, 2003). Sin embargo, el primer factor transcripcional específico en respuesta a la deficiencia de fosfato que se identificó y que se ha descrito que juega un papel clave en la modulación de varias PSR es Phosphate Starvation Response 1 (PHR1).

1.3.1 *PSR1* como precedente

El primer regulador de las respuestas a la deficiencia de fosfato se descubrió en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*; una cepa mutante de esta alga que presentaba claras manifestaciones de deficiencia de fosfato, como escasa inducción del aparato de transporte de Pi de alta afinidad y baja actividad de fosfatasas extracelulares, tenía una mutación en un gen denominado *PSR1* de localización nuclear el cual codifica para un factor transcripcional de tipo MYB, cuyos niveles de transcrito y proteína se incrementan en condiciones de deficiencia de Pi (Wykoff *et al.*, 1999). Rubio y colaboradores (2001) identificaron y caracterizaron en *Arabidopsis thaliana* un factor transcripcional estrechamente relacionado a *PSR1*. Para realizar esta identificación, se mutagenizaron plántulas de *Arabidopsis* que tenían integrado el gen reportero *GUS* fusionado al promotor de *AtIPS1*, cuya expresión se estimula por deficiencia de Pi. Mediante un ensayo de GUS se identificó una mutante que no presentó inducción de *AtIPS1::GUS* en condiciones de deficiencia de Pi, además de que mostraba un descenso en el contenido de Pi celular y en el peso fresco de la planta. A esta mutante se le denominó *phosphate response 1 (phr1)*. En contraste con la mutante, la sobreexpresión de *PHR1* en *Arabidopsis thaliana* promueve un incremento en el contenido de Pi en comparación con plantas silvestres, manifestando la importancia de este regulador en la adquisición de Pi (Nilsson *et al.*, 2010).

Estudios alternos revelaron que la mutante *phr1*, en comparación con la silvestre, presenta un decremento en los niveles de almidón en condiciones deficientes de fosfato y no así en condiciones de crecimiento óptimas (Rubio *et al.*, 2001). La disminución en el contenido de almidón podría evidenciar una reducción en la capacidad fotosintética o en la regulación del sistema biosintético, involucrando a *PHR1* en una respuesta cruzada entre las *PSR* y el metabolismo del carbono.

Del mismo modo que su ortólogo en *C. reinhardtii*, *PHR1* regula la expresión de varios genes involucrados en las respuestas a la deficiencia de fosfato, entre los que se encuentran *AtIPS1* y *At4*, que transcriben RNA's pequeños no codificantes; miR399, microRNA regulador inducible por inanición de fosfato; *RNS1*, codificante de una RNasa; *CHS* y *PAP1*, involucrados en la biosíntesis de antocianinas; *AtPHT1;7*, *AtPHT1;8* y *AtPHT1;9*, genes que codifican transportadores de fosfato de alta afinidad

(Rubio *et al.*, 2001; Bari *et al.*, 2006; Nilsson *et al.*, 2007). Todos estos genes responden a la deficiencia de fosfato y contienen en sus promotores una secuencia palindrómica, GNATATNC, a la cual PHR1 se une y es denominada, PHR1 Binding Sequence (P1BS) (Rubio *et al.*, 2001).

1.4 Cascada de transducción de señales mediada por PHR1

El modelo que se propone para plantas de *Arabidopsis thaliana* involucra la participación de *PHR1*, *PHO2*, *miR399*, *AtIPS1* y *At4*. La identificación de estos elementos comenzó con la caracterización de plantas mutantes de *PHO2* que tienen un aumento en la concentración de Pi en hojas, pero una concentración inalterada en raíces en comparación con plantas silvestres. Un análisis de los niveles de transcrito en *AtIPS1* y *At4* en mutantes *PHO2*, reveló que estos se encuentran elevados en deficiencia de Pi, así como los transcritos de *AtPHT1;8* y *AtPHT1;9*. El gen *PHO2* codifica para una ubiquitin conjugasa E2 denominada UBC24; las enzimas de tipo ubiquitin conjugasa catalizan la transferencia de una ubiquitina activada, a una proteína sustrato, ya sea directa o indirectamente vía una E3 ligasa, marcando a la proteína, que en muchos casos se va a degradación vía proteosoma (Smalle y Vierstra, 2004). Un estudio del mRNA de *PHO2* reveló sitios de unión a miR399 en su extremo 5'-UTR. El miR399 se estimula en deficiencia de fosfato y tiene como blanco el mRNA de *PHO2*, cuyos niveles se reducen rápidamente en ausencia de fosfato (Chiou *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2005). Se ha documentado un posible movimiento de miR399 de la parte aérea hacia la raíz durante la inanición de fosfato, sugiriendo un posible mecanismo de regulación a distancia sobre *PHO2* para limitar la translocación de Pi al tallo en respuesta a esta deficiencia nutrimental (Lin *et al.*, 2008). Las plantas que sobreexpresan el precursor de miR399, miR399d, presentan un fenotipo similar a la mutante *pho2*, así como una reducción en los transcritos de *PHO2*. Un estudio con plantas mutantes *phr1* crecidas en deficiencia de fosfato demostró que los niveles del microRNA399 descienden en comparación con las plantas silvestres (Bari *et al.*, 2006). Sobre la base de estos hechos, el modelo propone que una vez que se expresa miR399 éste llega a las células de la raíz, mediante transporte por el floema y se une a los

transcritos de *PHO2*, regulando negativamente la síntesis de UBC24. Esta reducción, ya sea directa o indirectamente, promueve una disminución en la degradación de sus blanco, lo cual lleva a la expresión de varios genes que responden a la deficiencia de Pi, como los transportadores de alta afinidad PHT1;8 y PHT1;9. La expresión de *AtIPS1* y *At4* se induce también por deficiencia de Pi y su expresión depende de PHR1 (Figura 3). Estos genes se transcriben como riboreguladores y se unen de una manera complementaria a miR399, en un proceso denominado ‘target mimicry’ (mimetización con el blanco). Este proceso le permite a la planta ajustar la respuesta ante la demanda, equilibrio y abasto de Pi (Fang *et al.*, 2009).

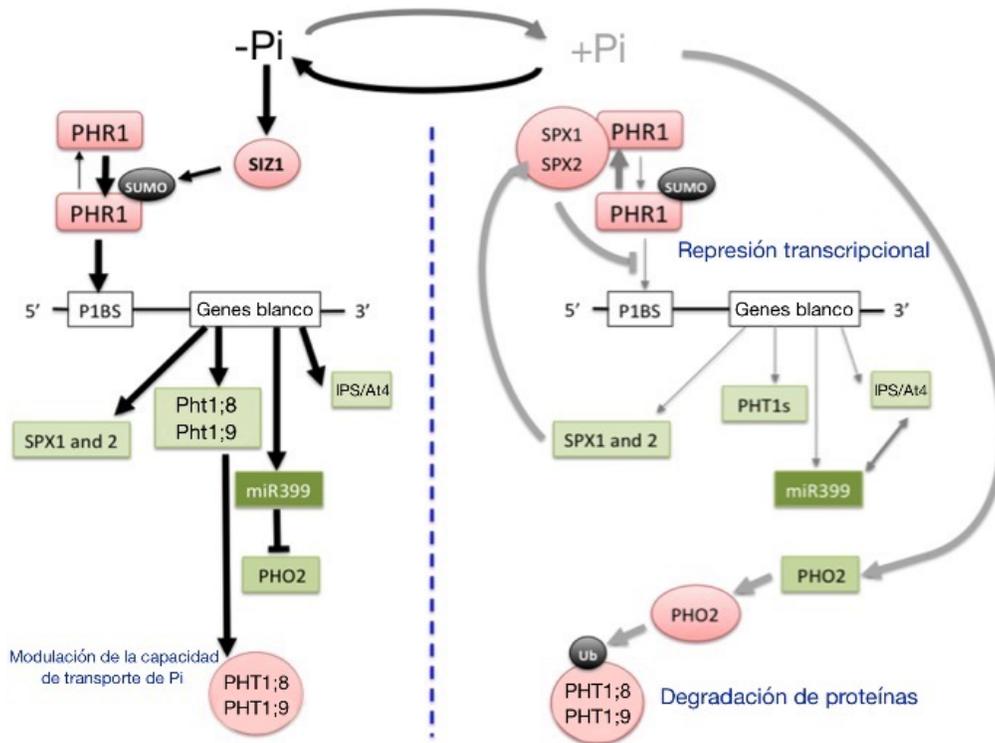


Figura 3. Cascada de transducción de señales mediada por PHR1. En suficiencia de Pi la alta actividad de PHO2/UBC24 resulta en bajos niveles de expresión de los transcritos *Pht1;8* y *Pht1;9*. Del mismo modo, PHR1 censa los niveles de Pi y no transcribe sus genes blanco. Cuando los niveles de Pi descienden en las hojas, PHR1 expresa a *miR399*, el cual llega a las raíces a través del floema; en las raíces, *miR399* se une a la región 5'UTR del mRNA de *PHO2*, llevándolo a su degradación. Esto resulta en un incremento de los niveles de expresión de los mRNA de los transportadores *Pht1;8* y *Pht1;9*, facilitando la captura y transporte de Pi, para mantener el óptimo crecimiento y desarrollo de la planta. Conforme continúa la deficiencia de Pi, se expresan, de manera dependiente de PHR1, los riboreguladores *AtIPS1/At4*, inhibiendo la acción de *miR399* sobre los transcritos de *PHO2* y permitiendo que los niveles de UBC24 se ajusten a los niveles de Pi. En verde: transcritos, en rojo: proteínas, en negro: modificaciones post-traduccionales, el grosor de las flechas es considerado proporcional a la fuerza del flujo (Modificado de Briat *et al.*, 2015).

La expresión de *PHR1* no se modifica tanto a nivel de transcrito como a nivel de proteína durante la deficiencia de Pi, a pesar de ser *PHR1* un regulador clave de las PSR; su localización nuclear tampoco es sensible a los cambios de régimen nutricional por Pi, lo que sugiere que su actividad está siendo regulada por una modificación post-traducciona, siendo la fosforilación una de las más importantes.

Un análisis con herramientas como PhosPhAt 4.0 y NetPhos 2.0 predicen que *PHR1* es susceptible de ser fosforilado pero no existen datos de la cinasa que está llevando a cabo esta regulación.

1.5 Familia de las proteínas cinasas SnRK

En plantas se ha identificado un complejo enzimático con actividad de cinasa que participa en la señalización celular de respuesta a estrés energético, en la regulación del metabolismo de carbohidratos y en la respuesta de diferentes tipos de estrés, entre ellos la deficiencia nutricional por fósforo (Coello *et al.*, 2011; Nunes *et al.*, 2013). A esta familia de proteínas cinasas se le denomina Sucrose non-fermenting (SNF) Related Kinase 1 (SnRK1), y forman parte de una familia conservada de proteínas cinasas serina-treonina independientes de calcio que incluye a la Sucrose non-Fermenting 1 (SNF1) de levaduras y a la AMP-activated Protein Kinase (AMPK) de mamíferos (Hardie, 2007; Halford y Hey, 2009). En plantas, esta familia de cinasas se compone por 38 miembros los cuales pueden ser divididos en tres subfamilias: SnRK1, SnRK2 y SnRK3. Tanto las cinasas tipo SnRK1 como las SnRK2 incrementan su actividad cuando las plantas se encuentran en condiciones de deficiencia de Pi, mientras que las tipo SnRK3 son cinasas distintivas de plantas que coordinan las respuestas a estrés osmótico (Figura 4).

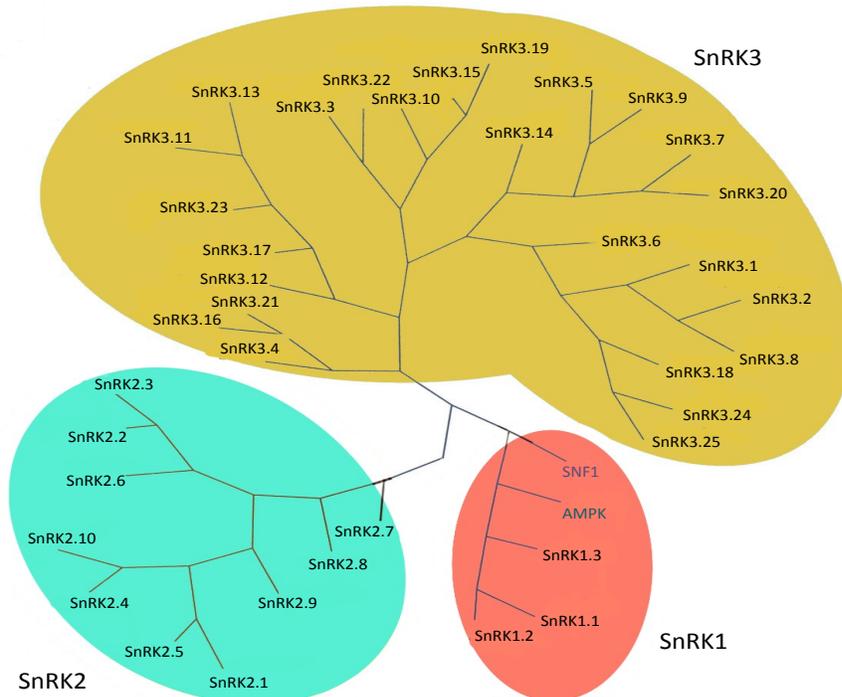


Figura 4. Diagrama de secuencias de la familia AMPK/SNF1/SnRK. El mapa representa la relación evolutiva entre las proteínas con base al alineamiento de sus dominios catalíticos. En naranja se define el grupo AMPK (*Homo sapiens*), SNF1 (*S. cerevisiae*) y SnRK1 (*Arabidopsis thaliana*). En azul se representa la familia SnRK2 y en amarillo la familia SnRK3 siendo la familia con mayor número de miembros (Modificado de Halford y Hey, 2009).

La familia de cinasas AMPK/SNF1/SnRK1 se activa por condiciones de estrés energético, permitiendo la homeostasis y la sobrevivencia del organismo al acelerar procesos catabólicos y limitar el metabolismo anabólico (Ghillebert *et al.*, 2011). Su función la realizan a través de la fosforilación directa de enzimas reguladoras de rutas metabólicas y por medio de la reprogramación transcripcional (Baena-González *et al.*, 2007) a través de la regulación de factores de transcripción (Figura 5).

Como regulador enzimático, las SnRK1 están implicadas en el control del metabolismo del carbono a través de la fosforilación directa de enzimas (Halford y Hey, 2009). Al momento se han documentado algunas proteínas como blanco de la SnRK1, entre ellas la 3-hidroximetil-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) que participa en la síntesis de esteroides e isoprenoides, la sacarosa fosfato sintasa (SPS) que se relaciona con la síntesis de sacarosa, la nitrato reductasa (NR) involucrada en la asimilación de nitrógeno y la trehalosa fosfato sintasa (TPS), una enzima reguladora de la síntesis de

trehalosa-6-P (Coello *et al.*, 2011) (Figura 5). Las SnRK1 regulan el metabolismo y la expresión génica a través de factores de transcripción y se ha estudiado a la familia de factores transcripcionales bZIP como la mayor respuesta transcripcional mediada por este complejo enzimático (Baena-González *et al.*, 2007). Por otro lado la transducción de señales en respuesta a condiciones de altas temperaturas y sequía está mediada por la hormona ABA, la cual activa diferentes genes que le permiten a la planta adaptarse a estas condiciones ambientales, algunas de estas señales están mediadas por la familia de cinasas tipo SnRK2 (Coello *et al.*, 2012).

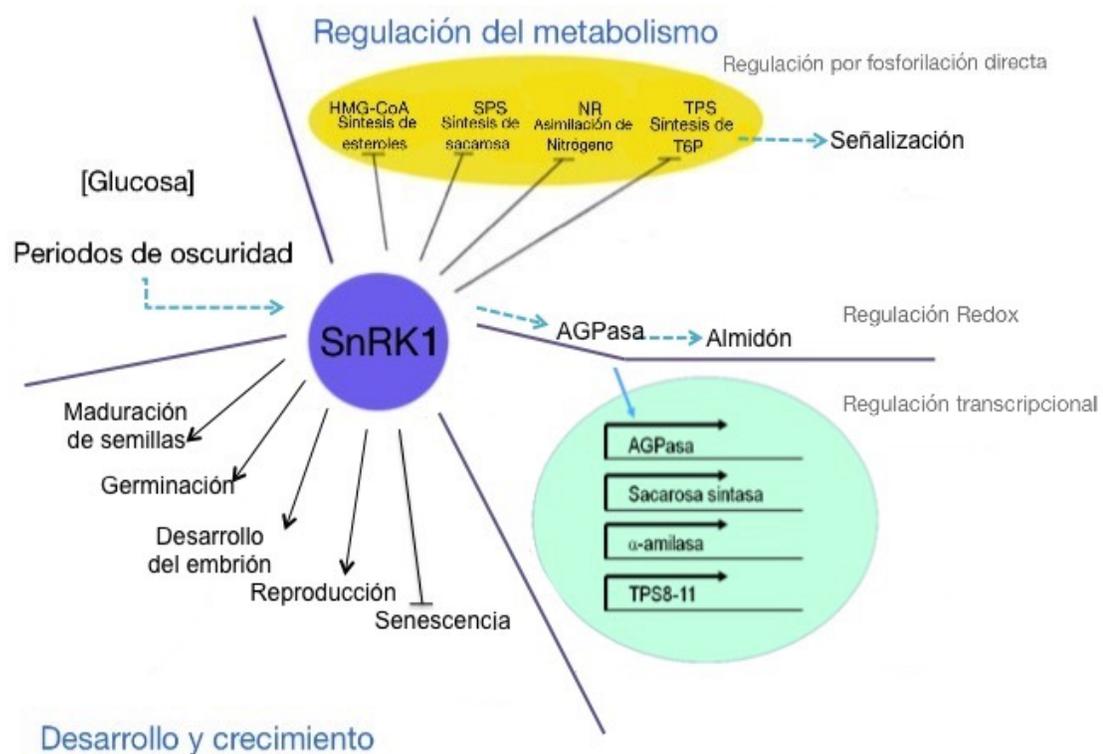


Figura 5. La SnRK1 como regulador energético global de la planta. El complejo heterotrimérico SnRK1 desata diversas respuestas celulares. En procesos sistémicos, la SnRK1 está implicada en procesos de desarrollo, crecimiento y reproducción; en la regulación del metabolismo a través de modificaciones post-traduccionales y el aumento en los niveles de expresión de transcritos cuyas proteínas tienen importancia metabólica, entre otras; indirectamente, la SnRK1 estimula la actividad de la AGPasa, enzima involucrada en la síntesis de almidón, regulándola mediante su estado redox y transcripcionalmente (Modificado de Polge y Thomas, 2007).

La familia de las SnRK2 se clasifica en tres grupos dependiendo de su respuesta al ácido abscísico (ABA). Son cerca de 145 a 160 aminoácidos más pequeñas que las SnRK1, presentándose en un tamaño cercano a los 40 kDa. Las proteínas SnRK2.2/2.3/2.6 son reguladores positivos de la señal de ABA en *Arabidopsis thaliana* (Mizoguchi *et al.*, 2010), estas cinasas fosforilan a factores transcripcionales responsables de la expresión de genes que responden a ABA, así como a canales iónicos que controlan la homeostasis osmótica, protegiendo a la planta de deshidratación o altas concentraciones de sales mediante el cierre de estomas (Yoshida *et al.*, 2002).

La familia de las SnRK3 está involucrada en respuesta a estrés osmótico provocado por concentraciones altas de iones; interaccionan con proteínas que unen calcio por lo que son consideradas calcio dependientes. Son parte de la vía de señalización conocida como Salt Overly Sensitive (SOS) (Liu *et al.*, 2000) que regula la homeostasis iónica, donde el complejo SOS2/SOS3 fosforila y activa el transportador SOS1, permitiendo controlar el equilibrio de sales al interior de la célula; el genoma de *Arabidopsis* codifica para 25 SnRK3, siendo la familia con mayor número de miembros.

1.5.1 Estructura de los complejos cinasa SNF1/AMPK/SnRK1

Esta familia de proteínas cinasas se componen por complejos heterotriméricos, constituidos por una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras, una β y otra γ (Hardie, 2007). Esta conformación es necesaria para que la proteína, en conjunto tenga actividad de cinasa. El número de complejos que se pueden formar varía significativamente entre organismos (Figura 6).

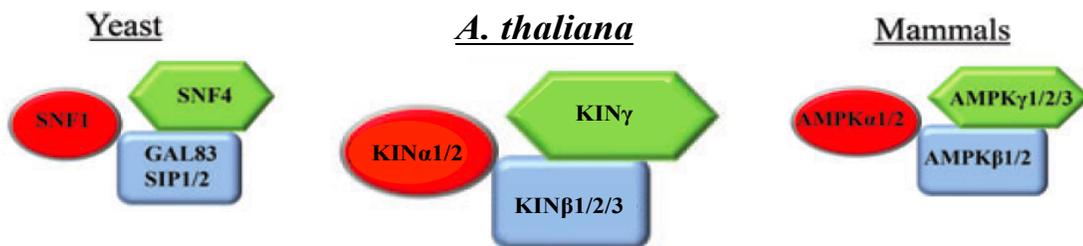


Figura 6. Composición del complejo heterotrimérico AMPK/SNF1/SnRK de diferentes organismos. Subunidad catalítica α (rojo), subunidad β (azul) y la subunidad γ (verde) (Modificado de Ghillebert *et al.*, 2011).

En *Saccharomyces cerevisiae* existe un gen que codifica para una subunidad catalítica α (*Snf1*), tres genes que codifican para las subunidades β -SNF1 (*Sip1*, *Sip2* y *Gal83*) y un gen que codifica para la subunidad γ -SNF1 (*Snf4*); así tres complejos diferentes de SNF1 pueden formarse. En mamíferos, existen dos genes que codifican para la subunidad catalítica ($\alpha1$ y $\alpha2$), dos para las subunidades reguladoras β ($\beta1$ y $\beta2$) y tres genes de las subunidades γ ($\gamma1$, $\gamma2$ y $\gamma3$). En *Arabidopsis thaliana* se han identificado tres genes para las subunidades catalíticas pero solo dos de ellos se expresan, *KIN α 1* y $\alpha2$, tres genes para las subunidades β -SnRK1 (*KIN β 1*, $\beta2$ y $\beta3$) y un gen para la subunidad γ (Polge y Thomas, 2007). La subunidad α es esencial debido a que presenta un grado alto de conservación entre las especies en las que se ha estudiado, las subunidades catalíticas de estos complejos presentan una identidad aproximada al 48%, pero si se restringe el análisis al dominio de cinasa, comparten entre el 60 y 65% de la secuencia respecto a sus homólogos en mamíferos y levaduras (Halford y Hey, 2009). Dada la presencia de múltiples subunidades, en plantas también se favorecería la presencia de diferentes complejos que pudieran tener funciones específicas (Ghillebert *et al.*, 2011).

1.5.2 La SnRK1 en la regulación de las PSR en planta

La actividad de SnRK1 se modifica durante la deficiencia de fosfato, lo cual abre la posibilidad de la participación de este complejo enzimático en la regulación de enzimas metabólicas y factores transcripcionales durante periodos de estrés energético (Fragoso *et al.*, 2009; Trejo, 2016). Una relación que existe entre la señalización de la deficiencia de Pi con la SnRK1, es que la actividad de SnRK1 es modulada por la presencia de sacarosa (Baena-González *et al.*, 2007) y que las PSR se ven intensificadas por la presencia de este carbohidrato (Hammond y White, 2008). Se han documentado cambios en los perfiles transcriptómicos durante la deficiencia de fosfato, dependientes de la actividad de SnRK1. La mutante de la subunidad catalítica $\alpha1$ de la SnRK1 de *A. thaliana* creciendo bajo condiciones de deficiencia de Pi, modificó la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos (Fragoso *et al.*, 2009).

Capítulo 2

ANTECEDENTES INMEDIATOS

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio de investigación han demostrado que el complejo enzimático SnRK1 participa en la regulación de las respuestas de las plantas a la deficiencia de fosfato (PSR). Una de estas respuestas es la acumulación de almidón observada en mutantes de la subunidad catalítica $\alpha 1$ de la SnRK1 de *Arabidopsis* en comparación con lo que ocurre en plantas silvestres sometidas a deficiencia de Pi. Además, existe una modificación en la reprogramación transcripcional en estos mutantes cuando son sometidos a deficiencia de Pi (Fragoso *et al.*, 2009). Un perfil de actividad de cinasas de la familia SnRK1 obtenido a partir de extractos proteicos de hojas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en condiciones normales y deficientes de Pi demostró un pico de actividad en fracciones que tienen un peso molecular entre 150 kDa y 250 kDa (Figura 7) lo que concuerda con el peso molecular predicho para el complejo enzimático (Nunes *et al.*, 2013). Es posible observar que en deficiencia de fosfato la actividad incrementa considerablemente indicando una estimulación de la actividad de SnRK1 en este intervalo de peso molecular y menores a 150 kDa, pudiendo existir en este rango cinasas de la familia SnRK2 (Coello *et al.*, 2012), reflejando así la posible participación de esta familia de cinasas en las PSR.

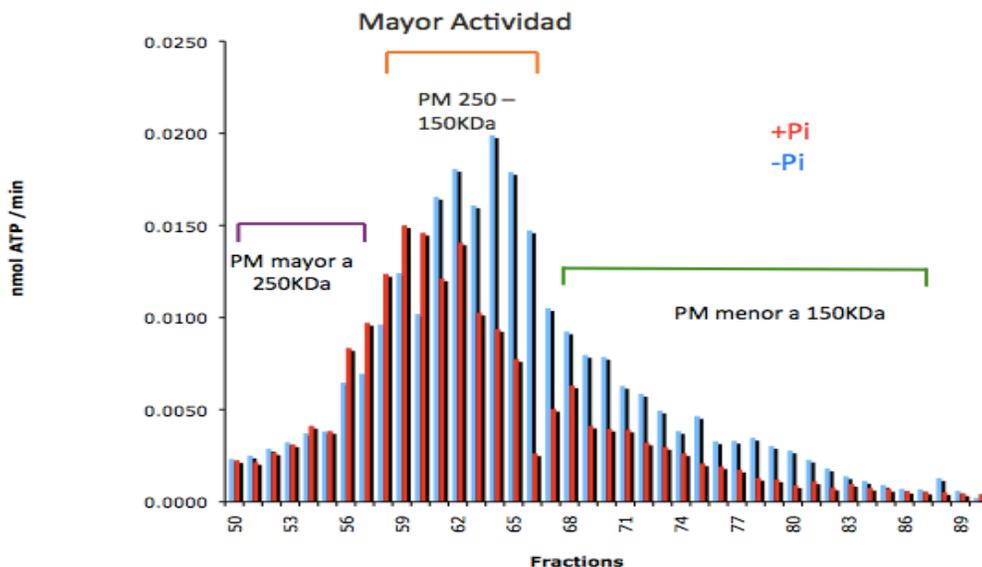


Figura 7. Actividad de SnRK de fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular de un extracto proteico de hojas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en suficiencia y deficiencia de fósforo (Guerrero, 2012).

Un análisis a nivel de transcrito en plántulas de *Arabidopsis* indica que en deficiencia de fósforo, uno de los miembros de las cinasas de la familia SnRK2, la SnRK2.6, aumenta su expresión (Coello *et al.*, 2012); estudios anteriores en el laboratorio revelaron que a nivel de proteína, la expresión de SnRK2.6 se encuentra en hojas y no en raíces y que la cantidad de proteína aumenta ligeramente en plántulas sometidas a una deficiencia nutrimental (Castillo, 2014). Con estas evidencias que relacionan a la familia de las SnRK's en las PSR, se realizó una búsqueda de posibles proteínas blanco de la SnRK1 utilizando el programa ScanProsite, encontrando tres proteínas con una secuencia consenso de fosforilación para SnRK y que están involucradas en las respuestas a la deficiencia de fósforo: la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante (np-G3PDH) y el factor de transcripción PHR1. Los ensayos *in vitro* realizados en nuestro grupo de laboratorio revelaron que la np-G3PDH y la PHR1 son fosforiladas al utilizarse un purificado parcial de SnRK1 (Figura 8) (Trejo, 2016).

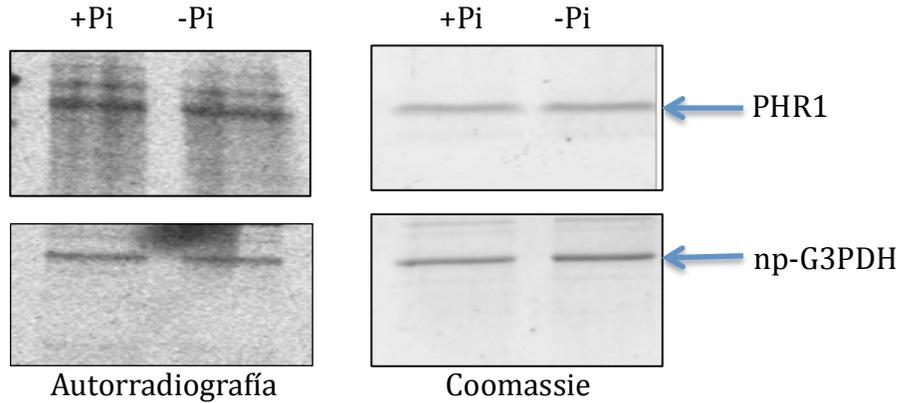


Figura 8. Proteínas fosforiladas por un extracto parcialmente purificado de SnRK1 obtenido a partir de plántulas crecidas en suficiencia y deficiencia de Pi. La autorradiografía revela la incorporación de ^{32}P a las proteínas. Se observa que no hay diferencia en el grado de fosforilación en ambas condiciones de crecimiento (Trejo, 2016).

El análisis de la secuencia de PHR1 identifica dos sitios potenciales de fosforilación en la Ser11 y Ser304 que teóricamente pueden ser reconocidos y fosforilados por cinasas de la familia SnRK (Figura 9), por esta razón es interesante determinar si uno o ambos sitios son blanco de la actividad de cinasa tipo SnRK.

-5		-3						+3	+4	
Met	Xxx	Arg	Xxx	Xxx	Ser	Xxx	Xxx	Xxx	Leu	
Leu		Lys			Thr			Leu	Phe	
Val		His						Phe	Ile	
Phe	Arg							Ile	Met	
Ile								Met	Val	
								Val		
Hyd	Xxx	Bas	Xxx	Xxx	Ser	Xxx	Xxx	Xxx	Hyd	consenso
Hyd	Xxx	Bas	Xxx	Xxx	Ser	Xxx	Xxx	Hyd	Xxx	
Val	His	Arg	Ser	Gly	Ser	Arg	Asp	Leu	Thr	PHR1 (S11)
Leu	Glu	His	Ile	Thr	Ser	Leu	Asp	Leu	Lys	PHR1 (S304)

Figura 9. Sitios de fosforilación de la PHR1. Los sitios putativos de fosforilación por parte de las cinasas de la familia SnRK en la PHR1 se encuentran en la Ser11 y Ser304.

2.1 Hipótesis

Complejos enzimáticos de la familia SnRK, reconocen y fosforilan la Ser11 y la Ser304 presentes en la secuencia del factor de transcripción PHR1.

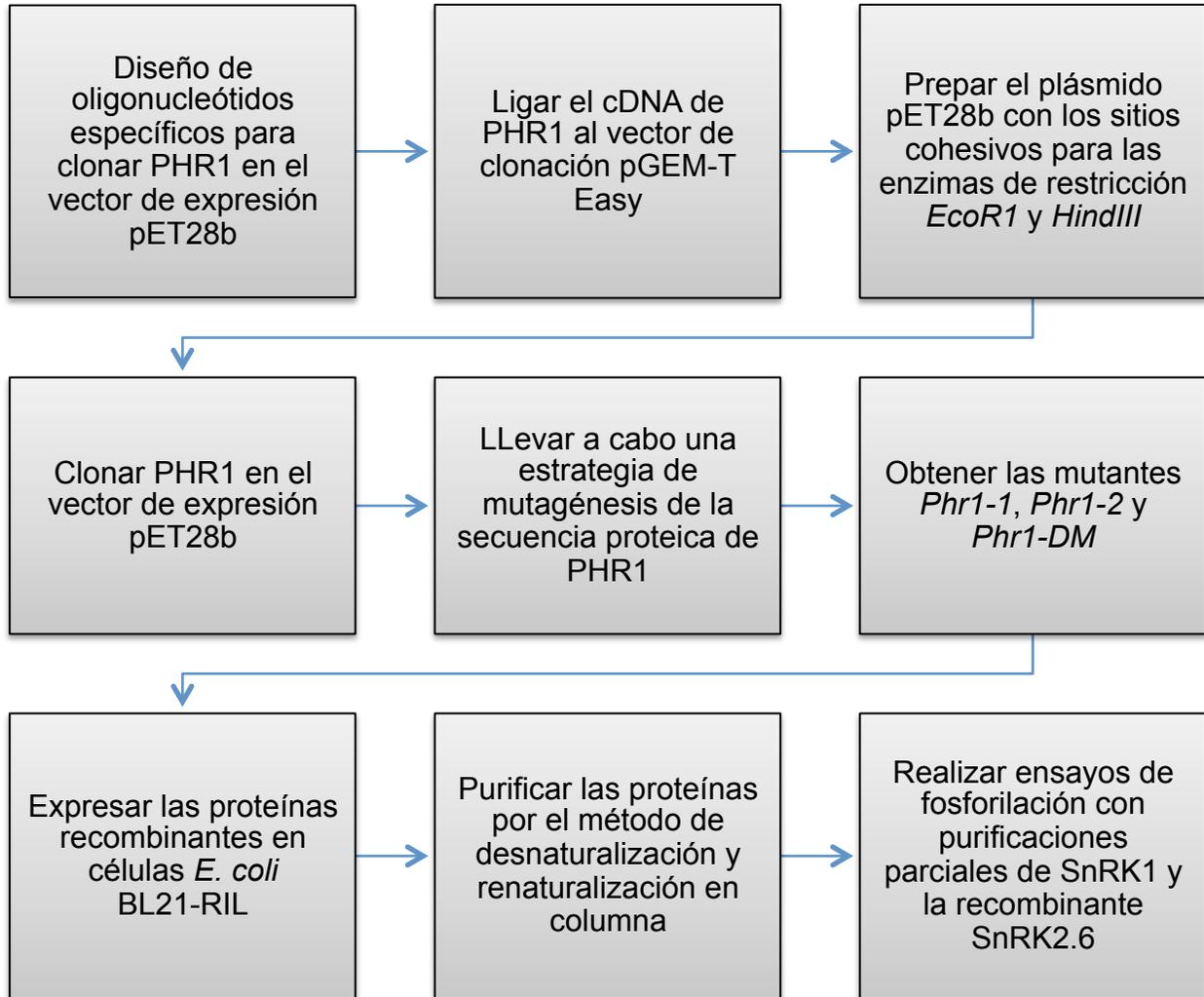
2.2 Objetivo general

Identificar los sitios de fosforilación por cinasas de la familia SnRK en el factor de transcripción PHR1 mediante la mutagénesis dirigida.

2.2.1 Objetivos particulares

1. Obtener el cDNA de PHR1 y clonarlo en el vector pGEM-T Easy y en el vector de expresión pET28b.
2. Obtener las mutantes *Phr1-1* (S11A), *Phr1-2* (S304A) y *Phr1-DM* (S11A S304A).
3. Expresar las proteínas recombinantes en células de *E. coli* BL21-RIL.
4. Realizar ensayos de fosforilación con purificaciones parciales de SnRK1 y con la proteína recombinante SnRK2.6.

Capítulo 3
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Clonación de la construcción PHR1 en el vector de expresión pET28b

4.1.1 Diseño de los oligonucleótidos específicos para clonar PHR1 en el vector pET28

A partir de la secuencia de nucleótidos de PHR1 (AT4G28610.1) obtenida de la base de datos de TAIR, se diseñaron los siguientes oligonucleótidos (Sigma-Aldrich):

fwd wt: 5' CCG **GAA TTC** GAT GGA GGC TCG TCC AGT TCA 3'

rev wt: 5' CCC **AAG CTT** ATT ATC GAT TTT GGG 3'

El oligonucleótido forward (fwd) adiciona el sitio *EcoRI* (en verde) a un extremo de la doble cadena del inserto y el oligonucleótido reverse (rev) introduce el sitio *HindIII* (en azul) al otro extremo de la doble cadena del inserto.

4.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Utilizando el plásmido purificado pGEM-PHR1 que contiene el cDNA de PHR1 y utilizando los oligonucleótidos mencionados en el punto anterior, se llevó a cabo la reacción de PCR bajo las siguientes condiciones: a un tubo eppendorf para PCR se agregaron 2.5 µL de amortiguador de PCR 10X, 1.5 µL de MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL de dNTP (10 mM), 1 µL del oligonucleótido fwd (10 µM), 1 µL del oligonucleótido rev (10 µM), 0.5 µL del plásmido pGEM-PHR1 (200 ng/µL), 0.3 µL de la enzima Taq polimerasa (1 U/µL), a un volumen final de 25 µL. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1 ciclo a 96°C por 2 minutos y 35 ciclos con periodos de 96°C por 0.20 minutos, 55°C por 0.30 minutos, 72°C por 4 minutos con una extensión final a 72°C por 7 minutos.

Los oligonucleótidos además de ayudar a la amplificación de los insertos, adicionan sitios de restricción; el fwd adiciona el sitio *EcoRI* a un extremo de la doble cadena, mientras el rev adiciona el sitio *HindIII* al otro extremo de la doble cadena del inserto.

4.1.3 Electroforesis en geles de agarosa para separar ácidos nucleicos

Los geles de agarosa se prepararon al 1% en amortiguador TAE 1X (40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM etilendiaminotetraacético (EDTA) pH 8.0 y 1 µL/mL bromuro de etidio). Las muestras se prepararon agregando amortiguador de carga que contiene 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xilen cianol, 0.25% de ficoll 400. La electroforesis se realizó utilizando un voltaje constante de 100 V.

4.1.4 Purificación de DNA de geles de agarosa

Los fragmentos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se purificaron utilizando el kit comercial PureLink™ Quick Gel Extraction (invitrogen™) siguiendo el procedimiento establecido por la casa comercial.

4.1.5 Ligación del cDNA de PHR1 en el vector de clonación pGEM-T Easy

El cDNA de PHR1 puro se ligó al vector de clonación pGEM-T Easy de Promega, siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial.

4.1.6 Transformación de células competentes *E. coli* DH5α

Las células competentes DH5α (cada alícuota contiene 100 µL de células) se descongelaron en hielo por 10 minutos y se les agregó 5 µL de la reacción de ligación para incubarlas en hielo durante 30 minutos. Se aplicó un choque térmico a 42°C por 30 segundos y las células se incubaron en hielo por 2 minutos. Se les agregó 400 µL de medio Luria Bertani (LB) estéril y se incubaron a 37°C en agitación constante (200 rpm) por 2 horas. Las células se plaquearon en cajas con medio LB-Ampicilina (LB/Amp) (100 µg/mL) que contenía 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosido (X-Gal) (50 µg/mL) e isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (1 M) y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Se seleccionaron colonias de color blanco y se incubaron en medio líquido LB-Amp a 37°C con agitación constante durante toda la noche. Se purificaron los plásmidos de las colonias seleccionadas utilizando el kit comercial GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial.

Para verificar que el inserto se encuentra incorporado al vector, se realizó un ensayo de restricción con la enzima *EcoRI* (Invitrogen™) y con la enzima *HindIII* (New England BioLabs™ Inc.) y el producto de la reacción se separó en un gel de agarosa.

4.1.7 Obtención y purificación del vector de expresión pET28b

Se sembraron células de *Escherichia coli* que contenían el plásmido pET28b en medio LB-Kanamicina (LB/Kan) (50 µg/mL) y el plásmido se purificó utilizando el kit comercial GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). El fragmento de DNA obtenido después de la digestión se purificó utilizando el kit comercial PureLink™ Quick Gel Extraction (Invitrogen™). El plásmido se digirió con las mismas enzimas de restricción, se trató con 1 µL de fosfatasa alcalina (10 U/µL) durante 20 minutos a 37°C y se aisló utilizando la misma metodología descrita anteriormente.

4.1.8 Ligación del cDNA de PHR1 en el vector de expresión pET28b

Para realizar la reacción de ligación se utilizaron 4 µL de pET28b (200 ng/µL), 1 µL de amortiguador de ligación 10X, 3 µL de PHR1 purificado (600 ng/µL), 1 µL de la enzima ligasa (3 U/µL), en un volumen final de 10 µL. Posteriormente, células competentes *E. coli* DH5α se transformaron con la reacción de ligación.

Se tomaron muestras de aquellas colonias que crecieron en medio LB/Kan para crecer cultivos líquidos. Los plásmidos se purificaron con el kit comercial GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Una vez purificados se realizó un ensayo de restricción con *EcoRI* y *HindIII* para verificar que el inserto se hubiera incorporado correctamente al vector pET28b. Finalmente, para corroborar que la construcción fuera la correcta, se envió a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

4.2 Diseño de los oligonucleótidos específicos para clonar a los mutantes *Phr1-1*, *Phr1-2* y *Phr1-DM* en el vector pET28b

Para la obtención del mutante *Phr1-1* se diseñó un oligonucleótido (Sigma-Aldrich) en dirección fwd (*MPhr1-1*) que inserta la mutación, en negritas. El oligonucleótido en dirección rev es el mismo que se utiliza para amplificar y clonar a PHR1 en pET28b.

MPhr1-1: 5' ATG GAG GCT CGT CCA GTT CAT AGA TCA GGT **GCG** AGA GAC 3'

Para la obtención del mutante *Phr1-2* se diseñaron dos oligonucleótidos (Sigma-Aldrich), donde ambos insertaron la mutación (en negritas), uno en dirección rev (*MAPhr1-2*) y otro en dirección fwd (*MSPhr1-2*):

MAPhr1-2: 5' TAT CCC ACC TTT CAA ATC AAG **GCG** TGT TAT ATG TTC AAG CGG 3'

MSPhr1-2: 5' CCG CTT GAA CAT ATA ACA **GCG** CTT GAT TTG AAA GGT GGG ATA 3'

El oligonucleótido *MAPhr1-2* y el oligonucleótido fwd wt amplifican un fragmento, mientras el oligonucleótido *MSPhr1-2* y el oligonucleótido rev wt amplifican otro fragmento, que posteriormente se alinean para formar una sola doble cadena con la mutación.

Para amplificar y clonar el doble mutante (*Phr1-DM*) en el vector pET28b se partió del cDNA molde de *Phr1-2*, se utilizó el oligonucleótido *MPhr1-1* y el oligonucleótido rev wt. El procedimiento exacto para llevar a cabo la mutagénesis se describe en el Anexo I.

4.2.1 Transformación de células competentes *E. coli* BL21-RIL

Se transformaron células competentes BL21-RIL con las construcciones pET28b-PHR1, pET28b-*Phr1-1*, pET28b-*Phr1-2* y pET28b-*Phr1-DM* siguiendo el mismo protocolo que se utiliza para la transformación de células *E. coli* DH5 α .

4.3 Expresión y purificación de las proteínas recombinantes PHR1 y mutantes por el método de desnaturalización y renaturalización en columna

Para la expresión de proteínas recombinantes, se tomó una colonia de *E. coli* BL21-RIL transformada con los plásmidos pET28b-PHR1, pET28b-*Phr1-1*, pET28b-*Phr1-2* y pET28b-*Phr1-DM*, se inoculó en tubos con 5 mL de LB/Kan (100 µg/mL) estériles, y se incubaron a 37°C con agitación constante toda la noche. De cada precultivo, se tomó un volumen para inocular matraces que contienen 50 mL de medio LB/Kan, que se incubaron a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.9-1.0 a 600 nm. Posteriormente, para poder obtener los mayores niveles de expresión de proteína para cada construcción, se probaron las siguientes condiciones (Tabla 1):

Tabla 1. Temperaturas de crecimiento y concentraciones de inductor IPTG probadas para establecer la mejor sobreexpresión de las proteínas recombinantes.

Temperatura	18°C	18°C	18°C	30°C	30°C	30°C
IPTG (mM)	0	0.5	1	0	0.5	1

*La inducción a 18°C dura 18 horas, mientras la inducción a 30°C dura 3 horas, todas en agitación constante (200 rpm).

Los cultivos se centrifugaron a 3,000 x g durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y las pastillas celulares se almacenaron a -70°C hasta su uso.

La pastilla celular se resuspendió en 8 mL de amortiguador de lisis con clorhidrato de guanidina (CH₅N₃·HCl 6 M, NaH₂PO₄ 20 mM pH 7.8, NaCl 500 mM). El extracto se mantuvo en movimiento suave durante 10 minutos a temperatura ambiente para promover la lisis, posteriormente se sonicó a una amplitud de 21 y 2 pulsos de 15 segundos utilizando un sonicador Sonics Vibra-Cell 37754. El extracto se centrifugó a 3,000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Para llevar a cabo una electroforesis SDS-PAGE con muestras en amortiguador de lisis con clorhidrato de guanidina fue necesario diluir o dializar las muestras antes de proceder para prevenir la precipitación del duodecilsulfato sódico (SDS). Los extractos de cada tratamiento se prepararon con amortiguador de carga 5X

(Tris 1 M pH 6.8, glicerol, SDS 1%, azul de bromofenol 10%, DTT) y las proteínas se separaron en un SDS-PAGE al 12%.

Para la expresión de volúmenes más grandes de cultivo, las células de cada construcción crecidas toda la noche, se inocularon en matraces que contenían 50 mL de medio LB/Kan. Se crecieron a 37°C con agitación constante hasta llegar a una densidad óptica de 0.9-1.0 a 600 nm. La expresión de la proteína se indujo agregando IPTG a la concentración apropiada y a la temperatura más favorable, siguiendo el protocolo descrito con anterioridad.

Para la purificación de la proteína recombinante, se equilibraron 2 mL de la resina ProBond™ Purification System (Life Technologies) con 6 mL de amortiguador de unión desnaturizante ($\text{CH}_5\text{N}_3\cdot\text{HCl}$ 8 M, NaH_2PO_4 20 mM pH 7.8, NaCl 500 mM). Se colocaron los 8 mL de lisado junto con la resina equilibrada, la cual se mantuvo en agitación constante durante 20 minutos a temperatura ambiente para favorecer la unión. La resina se dejó asentar por gravedad y se colectó la fracción no unida. La columna se lavó con el amortiguador de unión. Posteriormente, se utilizaron 4 mL de amortiguador de lavado desnaturizante ($\text{CH}_5\text{N}_3\cdot\text{HCl}$ 8 M, NaH_2PO_4 20 mM pH 6, NaCl 500 mM) resuspendiendo la resina por inversión durante 2 minutos y colectando la fracción. Este paso se repitió una vez más. El siguiente lavado se realizó con 8 mL de amortiguador de lavado nativo (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 0.5 M e imidazol 20 mM) resuspendiendo la resina por inversión durante 2 minutos como se describió anteriormente y este paso se repitió dos veces más.

Finalmente, la proteína ahora nativa se eluyó con 6 mL de amortiguador nativo (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 0.5 M e imidazol 250 mM), y se colectaron fracciones de 1 mL, se conservaron a 4°C hasta su análisis por SDS-PAGE.

4.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

La separación de proteínas en un gel SDS-PAGE se realizó de acuerdo al protocolo establecido por Laemmli, 1970. Las proteínas se mezclaron con el amortiguador de carga 5X y se desnaturalizaron a una temperatura de 80-90°C durante 5 minutos. Las

proteínas se separaron a través de un gel al 12% de la mezcla de acrilamida y un gel apilador al 3%. En algunos casos se usaron geles con un porcentaje de acrilamida del 10%, para una separación óptima de las proteínas de interés.

La electroforesis se realizó con solución amortiguadora de corrida (25 mM de Tris-HCl pH 8.3, 192 mM de glicina y 0.1% (m/v) de SDS) con un voltaje constante de 130 V. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie.

4.3.2 Microdiálisis

Las fracciones que contienen proteína pura y en concentración considerable se dializaron para retirar el exceso de sales utilizando un dispositivo con las tapas de tubos eppendorf en donde se añaden 200 μ L de la fracción proteica, el compartimento se sella con una membrana de celulosa (Sigma-Aldrich) que retiene proteínas mayores a 14 kDa. Los dispositivos se sumergen en amortiguador 50 mM Tris-HCl ajustado a pH 7.8 y se deja en agitación constante a 4°C durante toda la noche.

4.3.3 Cuantificación de proteína por el Método Colorimétrico de Bradford

Para conocer la concentración de proteína en las fracciones colectadas se empleó el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el stock 5X del reactivo Quick Start™ Bradford protein assay (Bio-Rad). Se construyó una curva de calibración con solución de albúmina sérica bovina (BSA) partiendo de una solución concentrada de ésta (1 mg/mL) (Tabla 2), la cantidad de proteína para cada punto fue la siguiente:

Tabla 2. Volúmenes empleados de BSA para la construcción de la curva de calibración.

Volumen de BSA 1 mg/mL (μ L)	Volumen de agua (μ L)	Volumen de Reactivo de Bradford 5X (μ L)	Masa de BSA (μ g)
0	800	200	0
2	798	200	2
4	796	200	4
6	794	200	6
8	792	200	8
10	790	200	10

Se registró la absorbancia en el espectrofotómetro (Ultrospec, 2000) a una longitud de onda de 595 nm utilizando una celda de plástico de 1 mL.

Las absorbancias que se obtienen en la curva patrón se utilizan para realizar un ajuste y conocer la ecuación de la recta ($y=mx+b$), en donde y = es la absorbancia, x = μg de proteína, m = pendiente y b = ordenada al origen, determinando también la linearidad de la recta (valor de r).

Para preparar las muestras a analizar, se tomaron 20 μL de la muestra proteica, se le agregaron 200 μL de reactivo de Bradford y la mezcla se llevó a 1 mL con agua. Leer la absorbancia de la misma forma que con la curva patrón y calcular la cantidad de proteína interpolando el valor de la absorbancia obtenida para cada muestra en la ecuación de la recta de la curva patrón.

4.3.4 Western blot

Las proteínas separadas en el SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de polivinilidenofluoruro (Immobilon-P Millipore), la transferencia se realiza utilizando un sistema húmedo con un voltaje constante de 100 V durante una hora en frío, utilizando un amortiguador de transferencia (124 mM de Tris-HCl, 96 mM de glicina y metanol al 20% v/v).

Posterior a la transferencia, la membrana se tiñó con colorante rojo de Ponceau (0.1% rojo de Ponceau y 5% ácido acético), y se eliminó lavando la membrana con agua destilada para observar el patrón de proteínas transferidas. La membrana se bloqueó con una solución de leche desgrasada en polvo al 5% (m/v), en PBST (amortiguador fosfato salino con Tween 20; NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 18 mM y 0.1% de Tween 20) durante una hora con agitación constante a temperatura ambiente. Después se agregó una solución de 5% (m/v) de leche desgrasada en PBST con el anticuerpo primario (anti-His Cell Signaling Technology) a una dilución de 1:10,000 y se dejó en incubación toda la noche a 4°C con agitación constante.

La membrana se lavó con PBST tres veces a intervalos de 10 minutos. Se adicionó el anticuerpo secundario (anti-conejo) a una dilución de 1:50,000 en PBST y se dejó incubar por una hora con agitación constante a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces con PBST a intervalos de 10 minutos y se reveló con el kit Immobilon

Western Chemiluminescent (Millipore) siguiendo las especificaciones de la casa comercial, detectándose la quimioluminiscencia en el equipo ChemiDoc MP System (BioRad).

4.4 Expresión y purificación de la proteína SnRK2.6

Para iniciar los experimentos de expresión, se transformaron células de *E. coli* BL21-DE3 con la construcción pGEX-SnRK2.6, siguiendo el protocolo descrito para la transformación de células *E. coli* DH5 α . Las condiciones óptimas de expresión de proteína se encuentran bien descritas en un trabajo anterior (Castillo, 2014). Brevemente, la expresión se realizó en 50 mL de medio LB-Amp (100 μ g/mL), con 1 mM de IPTG, a 37°C por 3 horas. El cultivo se centrifugó por 5 minutos a 3,600 x g, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 7.5 mL de PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na₂PO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 18 mM, pH 7.3) con 1 mM de PMSF y 1 mg/mL de lisozima. La mezcla bacteriana se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se sonicó con una amplitud de 21 y dos pulsos de 15 segundos (Sonics Vibra-Cell). El extracto se centrifugó a 7,200 x g por 15 minutos y la fracción soluble se utiliza para continuar con la purificación.

Se utilizó la columna de afinidad Glutación-Agarosa (Sigma-Aldrich) equilibrada con 10 mL de PBS 1X. La mezcla resina-fracción soluble se incubó en agitación constante por 1 hora a 4°C. Pasado el periodo de incubación, la mezcla se centrifugó a 4,600 x g por 10 minutos y el sobrenadante (fracción no unida) se descartó. La resina se resuspendió con 3 mL de PBS 1X y se colocó nuevamente en la columna para ser lavada con 5 volúmenes de PBS 1X. Las proteínas unidas se eluyeron con 10 mL de amortiguador de elución que contiene 50 mM de Tris y 10 mM de glutatión a pH 8.0; se recolectaron fracciones de 1 mL las cuáles se analizaron en una electroforesis SDS-PAGE.

4.5 Ensayos de fosforilación *in vitro*

Para llevar a cabo los experimentos de fosforilación con la cinasa SnRK1 sobre las proteínas recombinantes de PHR1, se obtuvo previamente una fracción parcialmente purificada de hojas de *Arabidopsis* (Guerrero, 2012; Trejo, 2016). Para el ensayo de

fosforilación, la mezcla de reacción de cinasa contiene 40 mM de HEPES pH 7.5, 5 mM de MgCl₂, 200 μM de adenosin trifosfato (ATP) que incluye 2 μCi de γ-³²P ATP (3,000 mCi), 4 mM de DTT, 1X de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich), 1X de inhibidor de fosfatasas, 2 μg de cada una de las proteínas y 1.5 μg de la SnRK1 purificada en un volumen final de 20 μL. La reacción inicia al agregar la cinasa incubando la mezcla por 30 minutos a 30°C. Transcurrido este tiempo, se agregó solución amortiguadora de carga para detener la reacción. Las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% y las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinilidenofluoruro (PVDF). La fosforilación se detectó por exposición de la membrana a una película de rayos X (GETM Technologies) durante tres días a -70°C en un cassette con pantallas amplificadoras.

Capítulo 5

RESULTADOS

5.1 Reacción en cadena de la polimerasa de *PHR1*

El cDNA que codifica para la proteína *PHR1* se amplificó mediante PCR con oligonucleótidos específicos que adicionaron los sitios de reconocimiento de las enzimas *EcoRI* y *HindIII* necesarios para futuras clonaciones. En la Figura 10 se presenta un gel de agarosa con el fragmento amplificado de *PHR1* que tiene un tamaño teórico de 1230 pb.

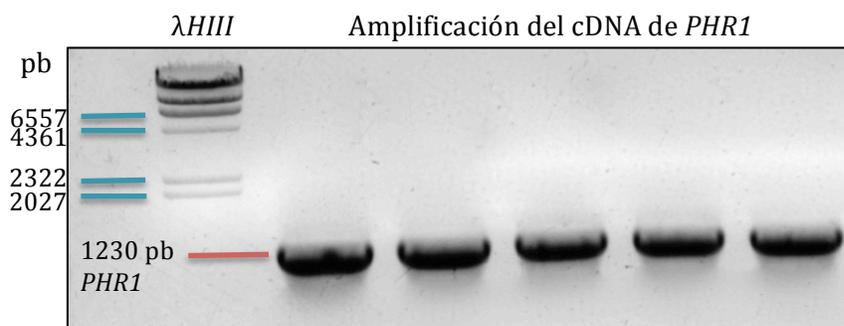


Figura 10. Amplificación del cDNA de *PHR1*. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde en el carril uno se observa el marcador de peso molecular λ HIII, mientras que del carril dos al cinco las bandas que corresponden a la amplificación del cDNA de *PHR1*.

El fragmento amplificado se purificó del gel para realizar la ligación al vector de clonación pGEM-T Easy.

5.2 Ligación del cDNA de *PHR1* en el vector de clonación pGEM-T Easy

El fragmento purificado de DNA se ligó al vector pGEM y se aisló el plásmido de cinco colonias transformantes, para determinar que estuviera incorporado al plásmido pGEM. Se realizó una digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. La digestión del vector de clonación con el cDNA dio como resultado la presencia de dos fragmentos en el gel de agarosa, como se presenta en la Figura 11; la banda superior corresponde al vector pGEM-T Easy (3015 pb) y la banda inferior al cDNA *PHR1* (1230 pb).

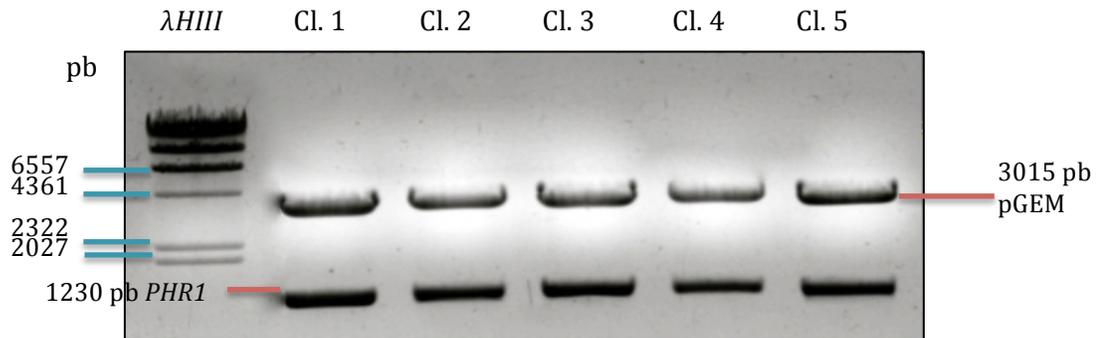


Figura 11. Digestión de pGEM-T Easy-PHR1. En el carril uno se observa el marcador de peso molecular λ HIII, mientras que del carril dos al seis las bandas que corresponden a la liberación del cDNA de *PHR1* con los sitios cohesivos para las enzimas de restricción utilizadas (1230 pb); se observan las bandas que corresponden al vector pGEM en 3015 pb.

El cDNA de *PHR1* se purificó de este gel para realizar la ligación al vector de expresión pET28b.

5.3 Incorporación de *PHR1* al vector de expresión pET28b

Primeramente se obtuvo y purificó el plásmido pET28b de células *E. coli* DH5 α de acuerdo a las condiciones establecidas en Materiales y Métodos (Figura 12).

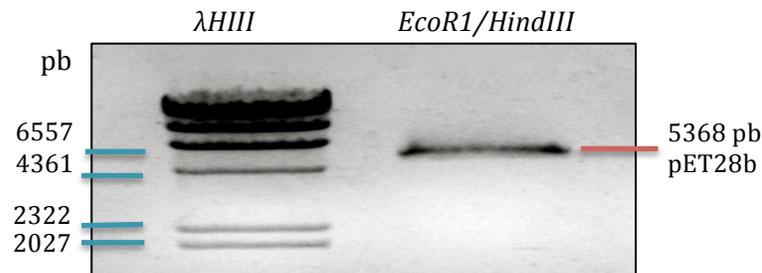


Figura 12. Purificación de pET28b. En el carril uno se observa el marcador de peso molecular λ HIII, mientras que en el carril dos se presenta la banda correspondiente al plásmido de expresión purificado (5368 pb); digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*.

El cDNA de *PHR1* purificado, se ligó al vector de expresión pET28b. La reacción de ligación se utilizó para transformar células DH5 α que fueron crecidas en medio sólido LB con Kanamicina como antibiótico selectivo.

Después de purificar el plásmido de algunas colonias seleccionadas, se realizó una digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para corroborar la incorporación del inserto en el vector.

En la Figura 13 se presenta el gel de agarosa con las bandas correspondientes a los plásmidos purificados de cuatro colonias. Se puede distinguir que en todas las purificaciones hay una banda ubicada entre el marcador de 6557 pb y 4361 pb, que corresponde al vector de expresión pET28b (5368 pb), y otra banda por debajo del marcador de 2027 pb que sería, en teoría, el cDNA de *PHR1* (1230 pb).

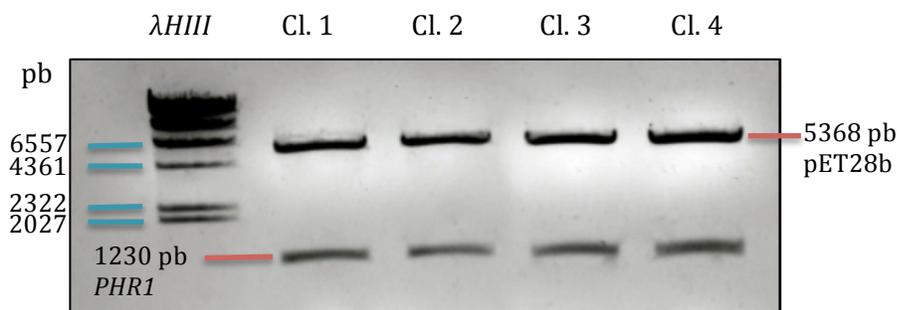


Figura 13. Digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* de la construcción pET28b-*PHR1*. En el carril uno se observa el marcador de peso molecular λHIII, mientras que del carril dos al cinco se presentan las bandas correspondientes al plásmido de expresión en 5368 pb y el inserto *PHR1* en 1230 pb.

Para verificar que la construcción se encontrara en fase y correspondiera al cDNA de *PHR1*, se envió al Laboratorio de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

5.4 Obtención de mutantes *Phr1-1*, *Phr1-2* y *Phr1-DM*

5.4.1 Incorporación de *Phr1-1* en el vector de expresión pET28b

Para la obtención de la mutante *Phr1-1* se amplificó el cDNA utilizando el oligonucleótido en dirección forward que inserta la mutación y el oligonucleótido en dirección reverse que se utilizó para amplificar a *PHR1* wt. El inserto se ligó al vector pGEM, se transformaron células *E. coli* DH5α y las transformantes se evaluaron mediante un ensayo de restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Se ligó el cDNA de *Phr1-1* purificado al vector de expresión pET28b, y finalmente se realizó un ensayo de

restricción con las enzimas de trabajo para verificar la incorporación del inserto en el vector (Figura 14).

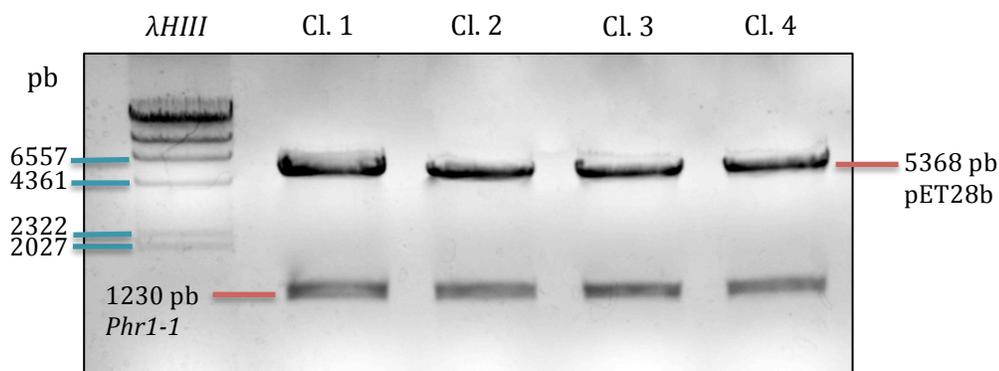


Figura 14. Digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* de la construcción pET28b-*Phr1-1*. En el carril uno se observa el marcador de peso molecular $\lambda HIII$, mientras que del carril dos al cinco se presentan las bandas correspondientes al plásmido de expresión en 5368 pb y el inserto *Phr1-1* en 1230 pb.

Para verificar que la construcción se encontrara en fase y tuviera la mutación que cambia la S11A, se envió a secuenciar al Laboratorio de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

5.4.2 Incorporación de *Phr1-2* en el vector de expresión pET28b

Para obtener el cDNA de *Phr1-2*, se llevó a cabo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Utilizando esta estrategia, se obtuvieron dos fragmentos de aproximadamente 900 pb y 350 pb (Figura 15).

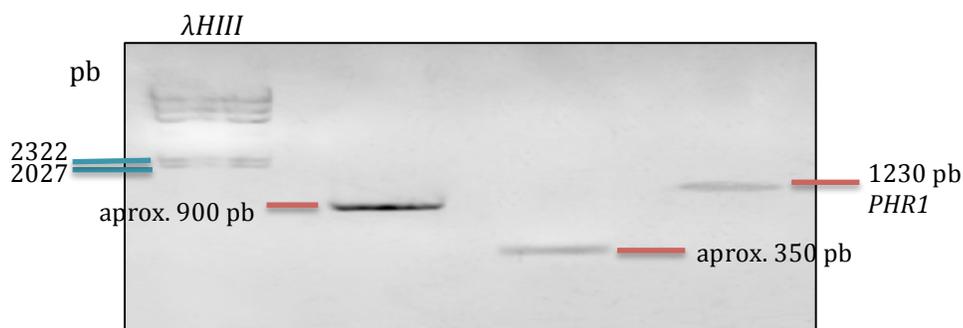


Figura 15. Amplificación de dos fragmentos de diferente extensión. Gel de agarosa al 1% donde se observa el marcador de peso molecular $\lambda HIII$, en el carril dos se presenta el fragmento de 900 pb, en el carril tres el fragmento de 350 pb, mientras que en el carril cuatro la banda que corresponde al cDNA completo de *PHR1* como comparativo.

Para la amplificación del fragmento completo, ambos se purificaron para formar una doble cadena con extremos protrusibles. Estos fragmentos se extendieron al incorporar la Taq polimerasa para formar un fragmento de doble cadena. Este fragmento se amplificó a través de una PCR convencional utilizando los oligonucleótidos para *PHR1* wt. En la Figura 16 se presenta el gel de agarosa con el fragmento amplificado del mutante en 1230 pb aproximadamente.

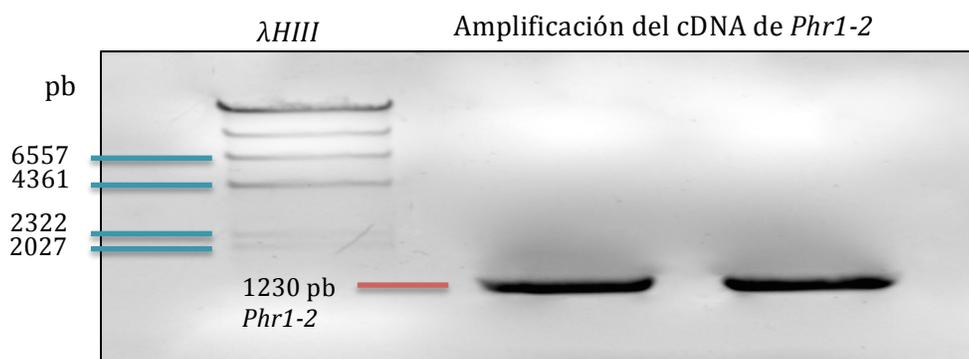


Figura 16. Amplificación del cDNA de *Phr1-2*. En el carril uno se observa el marcador de peso molecular $\lambda HIII$, mientras que en los siguientes dos carriles las bandas que corresponden a la amplificación del cDNA mutante.

El cDNA se purificó de este gel para realizar la ligación al vector de clonación pGEM-T Easy. Una vez en el vector de clonación, se transformaron células *E. coli* DH5 α y las transformantes se evaluaron mediante un ensayo de restricción. Se ligó el cDNA de *Phr1-2* purificado, al vector de expresión pET28b, y después de purificar el plásmido de las colonias resistentes al antibiótico, se realizó un ensayo de restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para verificar la incorporación del inserto en el vector. En la Figura 17 se puede distinguir que en plásmidos provenientes de dos colonias, se observan los dos fragmentos de restricción correspondientes al plásmido y al inserto, en un peso de 5368 pb para el plásmido y de 1230 pb para *Phr1-2*.

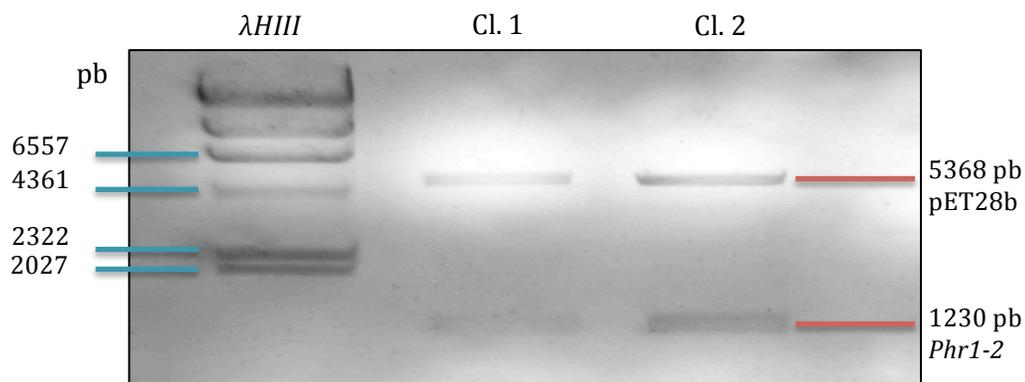


Figura 17. Digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* de la construcción pET28b-*Phr1-2*. En el carril uno se observa el marcador de peso molecular λ HIII, mientras que en los siguientes carriles se presentan las bandas correspondientes al plásmido de expresión en 5368 pb y el inserto *Phr1-2* en 1230 pb.

Para corroborar que la construcción se encontrara en fase y tuviera la mutación S304A, se envió a secuenciar al Laboratorio de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

5.4.3 Incorporación de *Phr1-DM* en el vector de expresión pET28b

Para la obtención de la doble mutante se partió del cDNA molde de *Phr1-2* que presenta una mutación puntual interna, utilizando el mismo oligonucleótido en dirección forward que se utilizó para amplificar a *Phr1-1* según se describe en Materiales y Métodos.

El inserto amplificado se clonó en el vector pGEM y posteriormente en el vector de expresión pET28b; el ensayo de restricción con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* liberaron un inserto del tamaño esperado para *Phr1-DM* en 1230 pb (Figura 18).

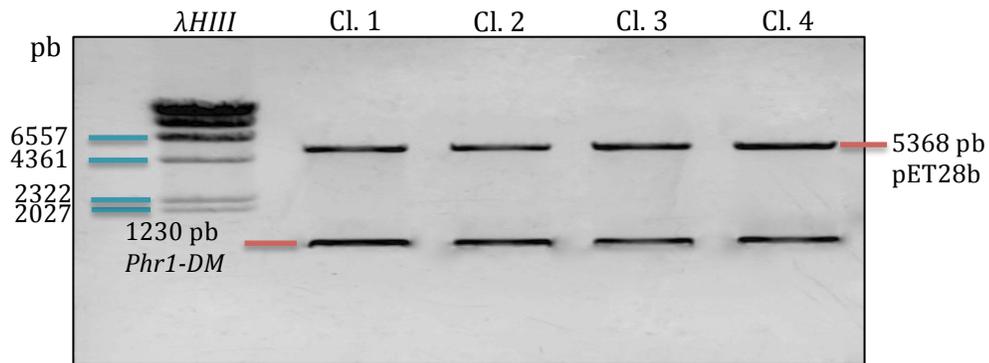


Figura 18. Digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* de la construcción pET28b-*Phr1-DM*. En el carril uno se observa el marcador de peso molecular λ HIII, mientras que del carril dos al cinco se presentan las bandas correspondientes al plásmido de expresión en 5368 pb y el inserto *Phr1-DM* en 1230 pb.

Para corroborar que la construcción se encontrara en fase y tuviera las mutaciones S11A S304A, se envió a secuenciar al Laboratorio de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

5.5 Obtención de las proteínas PHR1 y mutantes

5.5.1 Sobreexpresión de la proteína recombinante PHR1

La proteína se expresó en células de *E. coli* BL21-RIL probándose diferentes temperaturas de inducción y concentración de inductor para determinar la condición que producía la mayor cantidad de proteína.

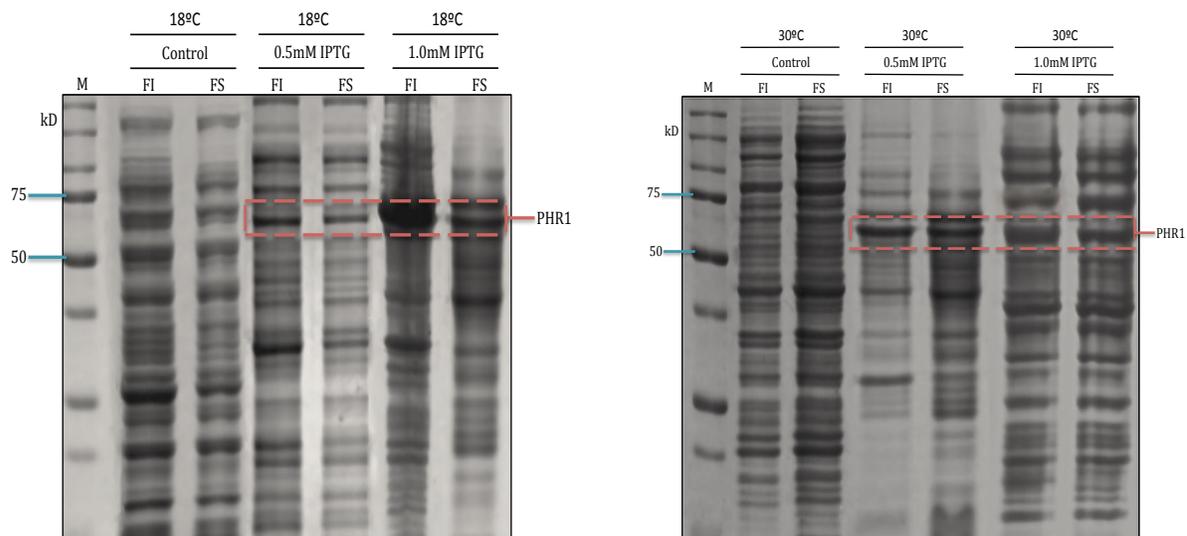


Figura 19. Sobreexpresión de la proteína PHR1. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie presentando las fracciones que fueron obtenidas a diferentes temperaturas de inducción (18°C y 30°C) y con diferentes concentraciones de IPTG (0.5 mM y 1.0 mM). El control se realizó con células *E. coli* BL21-RIL sin transformar con el plásmido pET28b.

La proteína PHR1 tiene una masa molecular teórica de 46 kDa. En este caso, al clonarse en pET28b, el vector provee una etiqueta de 6 xHis tanto en el extremo amino como en el carboxilo terminal que eleva su peso molecular aproximadamente a 54 kDa. En la Figura 19 se aprecia una sobreexpresión que aparece alrededor de los 60 kDa en aquellos tratamientos donde se indujo con IPTG, existiendo una mayor sobreexpresión en la fracción insoluble, es decir, en los cuerpos de inclusión a 18°C y a una concentración de inductor de 1 mM. A 30°C se observa una sobreexpresión en ambas condiciones de inducción, sin embargo el aumento en la cantidad de inductor IPTG no incrementó la cantidad de la proteína recombinante. Por esta razón, encontrándose la mayor parte de la proteína en los cuerpos de inclusión a una temperatura de 18°C y a altas concentraciones de IPTG, se realizó la purificación de esta proteína por el método de desnaturalización y renaturalización en columna de afinidad, escalando el experimento a una temperatura de inducción a 18°C durante 18 horas usando 1 mM de IPTG.

5.5.2 Purificación de la proteína recombinante PHR1 por el método de desnaturalización y renaturalización en columna

La proteína expresada se purificó mediante una columna con la resina de afinidad ProBond™; esta resina de agarosa tiene acoplado un átomo de Ni capaz de retener proteínas con una etiqueta de 6 xHis, facilitando la purificación.

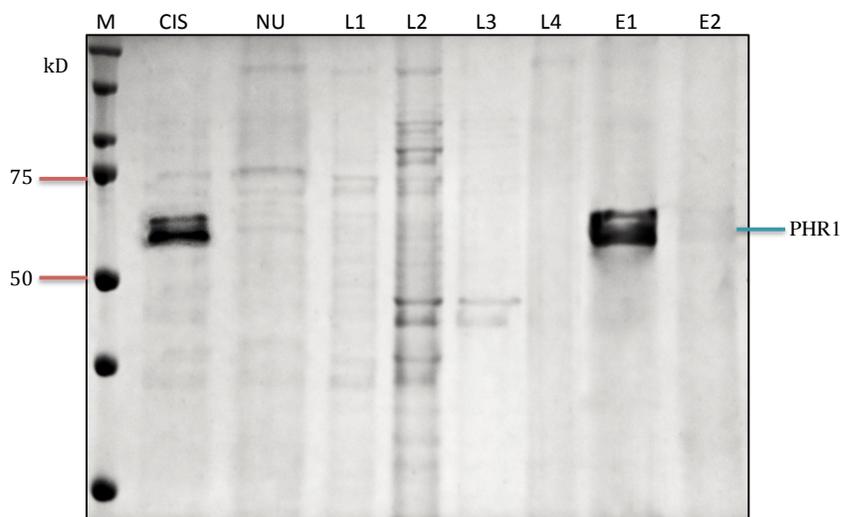


Figura 20. Purificación de la proteína PHR1. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie presentando las fracciones obtenidas a partir de la purificación de la proteína por medio de la resina de agarosa ProBond™. CIS, cuerpos de inclusión solubilizados; NU, fracción no unida; L, lavados; E, elución.

En la Figura 20 se observa una banda proteica prominente en la fracción de los cuerpos de inclusión solubilizados (CIS) y después aparece esa misma banda ahora enriquecida en la fracción de elución E1. Esta proteína correspondería a la fracción renaturalizada. La purificación de las proteínas mutantes Phr1-1, Phr1-2 y la doble mutante se purificaron siguiendo el mismo procedimiento. En la Figura 21 se presenta a las cuatro proteínas recombinantes purificadas.

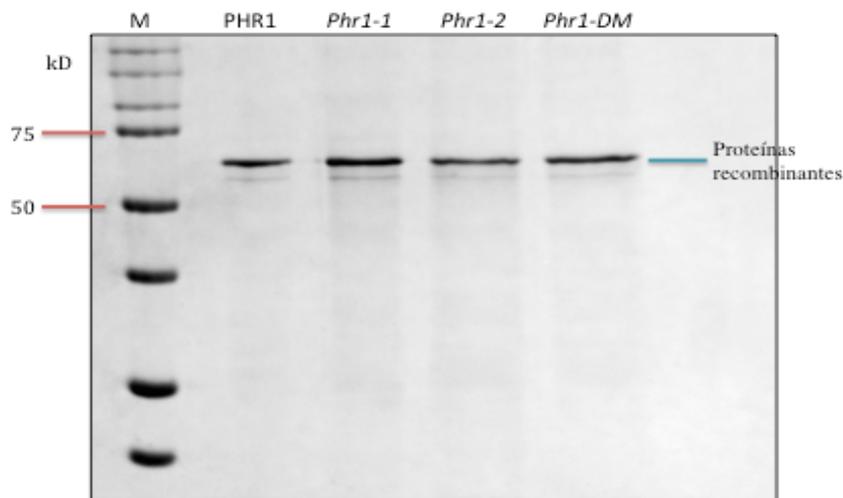


Figura 21. Obtención de las proteínas purificadas PHR1 y mutantes. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie donde se observan las bandas correspondientes a las cuatro proteínas recombinantes, todas éstas en un peso molecular aproximado de 65 kDa.

Para cerciorarse de que las proteínas purificadas fueran las de interés, se realizó un Western blot utilizando el anticuerpo anti-His que reconoce la etiqueta que tiene la proteína recombinante, tanto en el extremo amino como en el carboxilo terminal. El resultado mostró que el anticuerpo reconoce a las cuatro proteínas Phr1, junto con un control de una proteína recombinante $\beta 2$, que también tiene una cola de histidinas (Figura 22).

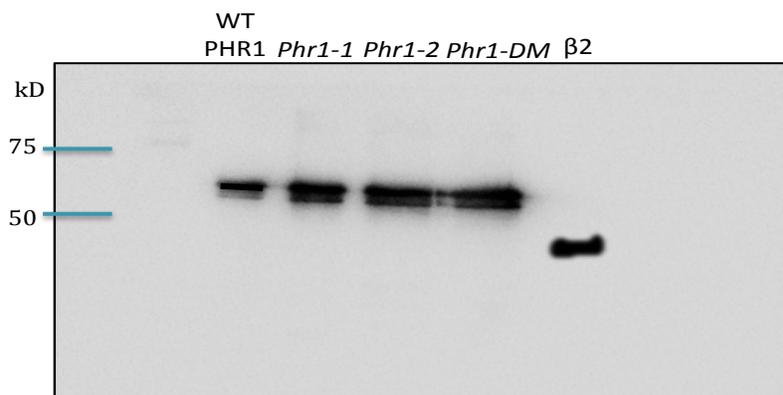


Figura 22. Western blot de las proteínas PHR1 y mutantes. Se utilizó el anticuerpo anti-His en una dilución 1:10,000, las cuatro proteínas recombinantes purificadas son reconocidas por el anticuerpo, todas éstas en un peso molecular aproximado de 65 kDa. La proteína $\beta 2$ ejerció como control positivo de 6 xHis.

Para proseguir con los ensayos de fosforilación, las fracciones eluidas que contienen a la proteína, se dializaron en un amortiguador 25 mM de Tris-HCl pH 7.8 durante toda la noche. Las proteínas dializadas se cuantificaron por el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

5.6 Obtención de la proteína recombinante SnRK2.6

Una proteína cinasa de la familia SnRK2 se ha documentado que se regula por déficit de fosfato tanto a nivel de transcrito como de proteína. Para determinar si esta subfamilia de cinasas puede fosforilar a Phr1, se sobreexpresó la proteína recombinante SnRK2.6 de acuerdo a condiciones descritas anteriormente en el laboratorio (Castillo, 2014).

La proteína se purificó a través de una columna de Glutación-agarosa. La Glutación S-transferasa de *Schistosoma japonicum* es la que se expresa a partir de la secuencia del vector pGEX4T2 con un peso molecular de 26 kDa, ésta se encuentra fusionada a la proteína SnRK2.6 (42 kDa) formando una proteína recombinante con un PM de 68 kDa. En la Figura 23 se aprecia que la primera elución se encuentra enriquecida con la proteína SnRK2.6.

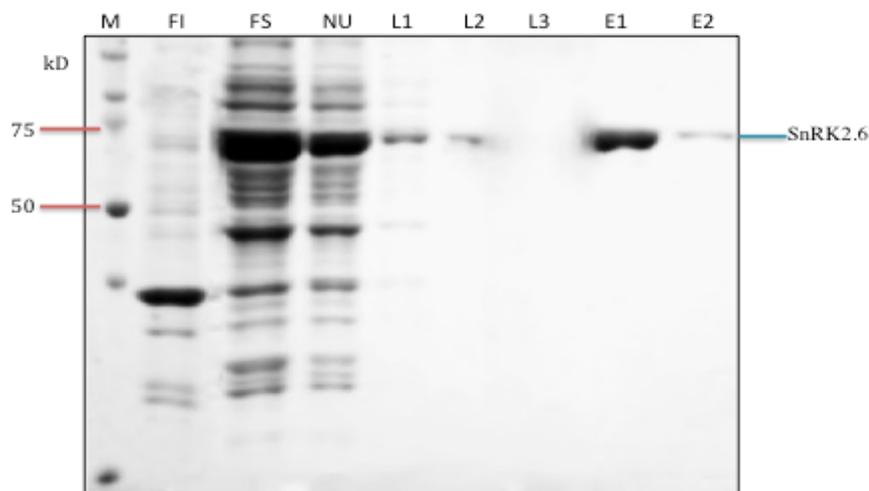


Figura 23. Purificación de la proteína SnRK2.6. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie que presenta las fracciones obtenidas a partir de la purificación de la proteína por medio de la resina de glutación agarosa. La proteína recombinante SnRK2.6 fusionada a GST se encuentra en un peso molecular aproximado de 70 kDa.

La fracción eluída que contiene a la proteína se dializó en un amortiguador que contenía 25 mM de Tris-HCl pH 7.8 durante la noche. Una vez dializada, se cuantificó por el método colorimétrico de Bradford y se almacenó a -70°C hasta su uso. Esta proteína se utilizó para probarse como cinasa de PHR1.

5.7 Ensayos de fosforilación *in vitro*

Un trabajo realizado previamente en el laboratorio probó que PHR1 es fosforilada al utilizarse un extracto parcialmente purificado con actividad de SnRK1 obtenido de hojas (Trejo, 2016). Se demostró que no existe diferencia en el grado de fosforilación de PHR1 usando la actividad enzimática de SnRK1 de hojas de plantas que crecieron en suficiencia o deficiencia de Pi (Trejo, 2016), teniendo evidencia de que PHR1 es blanco de SnRK1 *in vitro*. Para determinar el sitio sobre el cual está actuando SnRK1 en el factor transcripcional, se procedieron a realizar los ensayos de fosforilación de PHR1 y de las proteínas recombinantes con la mutación en la S11A y en la S304A, así como la proteína PHR1 con las dos mutaciones para identificar si los complejos enzimáticos de la familia SnRK, reconocen y fosforilan la Ser11 y la Ser304, presentes en la secuencia del factor de transcripción PHR1.

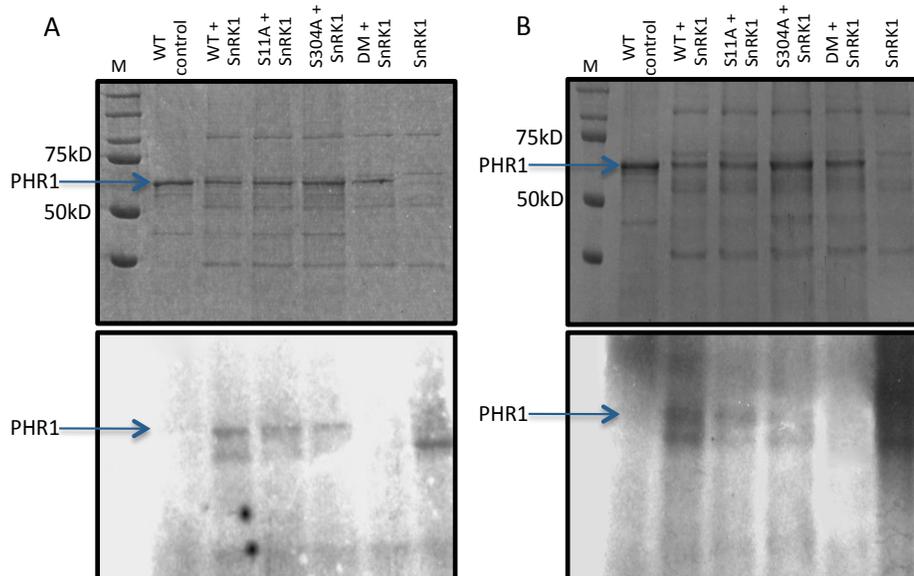


Figura 24. Fosforilación *in vitro* de PHR1. El ensayo se realizó sobre PHR1 con un extracto parcialmente purificado de SnRK1 obtenido de hojas crecidas en un régimen suficiente de Pi. A) Arriba, membrana teñida con rojo de Ponceau donde se señalan las bandas correspondientes a PHR1 y a las mutantes en un peso molecular aproximado de 65 kDa. Abajo, autorradiografía presentando la incorporación de ^{32}P a las proteínas por parte del extracto de SnRK1. B) Réplica del ensayo de fosforilación, empleando en esta ocasión un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. Arriba, SDS-PAGE donde se señalan las bandas correspondientes a PHR1 y a las mutantes en un peso molecular aproximado de 65 kDa. Abajo, autorradiografía presentando la incorporación de ^{32}P a las proteínas por parte del extracto de SnRK1. (DM=Doble mutante).

En la Figura 24 se revela el resultado de los ensayos de fosforilación utilizando un extracto parcialmente puro de SnRK1 proveniente de hojas crecidas en suficiencia de fósforo. En ambos experimentos se presenta la incorporación de ^{32}P a las proteínas e indican que cuando el sitio S304A es modificado hay fosforilación en el sitio S11 y cuando el sitio S11A se modifica, existe fosforilación en el sitio S304. Lo anterior se confirmó al observar que la doble mutante (S11A S304A) no fue fosforilada. Se distingue otra banda de fosforilación que muy probablemente corresponde a la autofosforilación de SnRK1. Es importante mencionar que aun cuando ambas proteínas mutantes son fosforiladas, se aprecia una ligera disminución de ^{32}P incorporado a la mutante S304A (*Phr1-2*) en ambas repeticiones.

Antecedentes previos demuestran que en deficiencia de fosfato uno de los miembros de las cinasas de la familia SnRK2, SnRK2.6, aumenta su expresión a nivel de transcrito; en este estudio se probó si SnRK2.6 podría reconocer a PHR1 como blanco de fosforilación.

En la Figura 25 se observa el resultado de los ensayos de fosforilación sobre PHR1 utilizando a la proteína recombinante SnRK2.6 para probar su actividad de cinasa, en ambas reproducciones del ensayo las autorradiografías presentan la incorporación de ^{32}P a la proteína SnRK2.6, no así a PHR1.

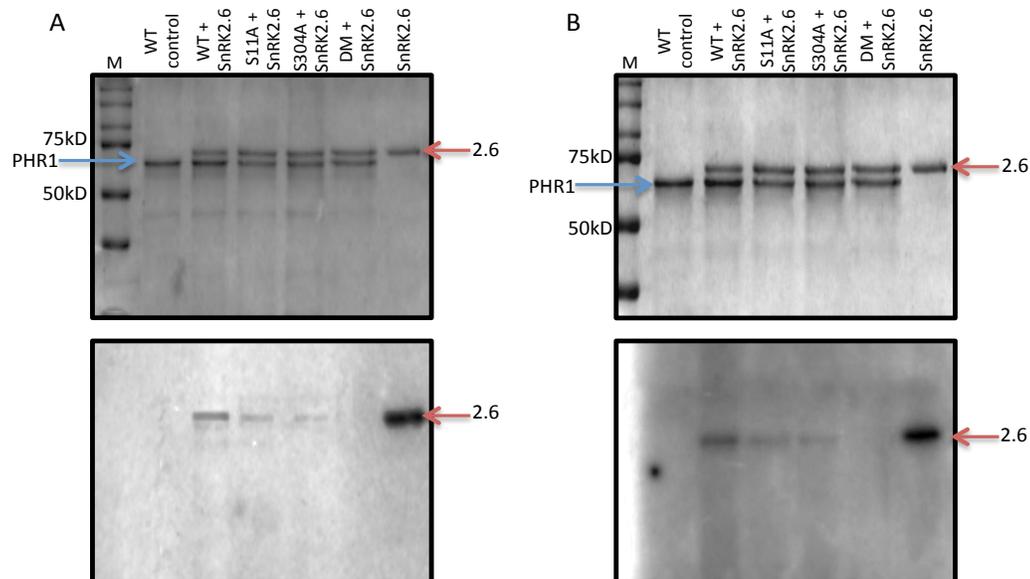


Figura 25. Ensayos de fosforilación sobre PHR1 con la proteína recombinante SnRK2.6. A) Arriba, membrana teñida con rojo de Ponceau donde se señalan las bandas correspondientes a PHR1 y a las mutantes en un peso molecular aproximado de 65 kDa y las bandas correspondientes a la recombinante SnRK2.6 en un peso aproximado de 70kDa. Abajo, autorradiografía presentando la incorporación de ^{32}P a la proteína SnRK2.6. B) Réplica del ensayo de fosforilación, empleando en esta ocasión un gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie. Arriba, SDS-PAGE donde se señalan las bandas correspondientes a PHR1 y a las mutantes en un peso molecular aproximado de 65 kDa y las bandas correspondientes a la recombinante SnRK2.6 en un peso aproximado de 70 kDa. Abajo, autorradiografía presentando la incorporación de ^{32}P a la proteína SnRK2.6.

Cabe mencionar que SnRK2.6 presentó mayor autofosforilación cuando se puso en contacto con PHR1 wt y la autofosforilación siguió un patrón de decremento igual al observado a los ensayos de fosforilación utilizando un extracto parcialmente puro de SnRK1, como se observa en las figuras 24 y 25. Cuando SnRK2.6 se pone en contacto

con la mutante S11A (*Phr1-1*) la autofosforilación es menor a la observada con la wt, cuando SnRK2.6 está en contacto con la mutante S304A (*Phr1-2*) el abatimiento es aun mayor comparado con las incorporaciones de ^{32}P anteriores y se demuestra también que SnRK2.6 no presenta autofosforilación en contacto con la doble mutante. Estos resultados parecen indicar que la presencia de las proteínas mutantes de PHR1 abaten la autofosforilación de SnRK2.6.

Capítulo 6

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El crecimiento de las plantas se modula mediante la integración de señales endógenas y exógenas (factores ambientales), basándose en la detección y señalización ante cambios en el estado interno y externo de la planta para una óptima y adecuada respuesta. La red de señalización que involucra la detección y disponibilidad de fosfato en la planta emplea dos tipos de acción, la señalización local y la sistémica. La primera depende de la concentración de Pi externo y del paso del Pi hacia el interior de la célula; y la sistémica depende del estado de Pi a nivel de todo el organismo implicando una señalización a larga distancia. La señalización sistémica se identificó en un experimento muy interesante basado en la división de las raíces (Split-root) en donde una parte se colocó en ausencia de fosfato y la otra en presencia del nutrimento. El análisis transcriptómico global reveló que genes implicados que se estimulan por deficiencia de Pi en raíces, son reprimidos cuando se agrega Pi a las hojas (Thibaud *et al.*, 2010).

Concentraciones altas de Pi intracelular pueden reprimir algunas respuestas a la deficiencia de Pi (PSR). En este contexto se entiende al Pi en sí como una señal temprana para la planta; sin embargo, debido a que el Pi es un nutriente, la supresión de algunas PSR pueden explicarse como efecto de una nutrición adecuada en lugar de una señalización por Pi. Existen pruebas convincentes obtenidas de los resultados de la aplicación de fosfito (Phi) que apoyan la noción de que el Pi sirve como una molécula señalizadora para la planta. El Phi es tomado por las plantas a través de transportadores de Pi; no puede ser oxidado a Pi o metabolizado una vez dentro de la célula. En una deficiencia de Pi, la aplicación exógena de Phi atenúa una amplia gama de PSR, incluyendo una reducción en la biomasa de la raíz al brote, crecimiento de pelos radiculares, acumulación de antocianinas, remodelación lipídica y la expresión de varios genes inducidos por deficiencia de fosfato (PSI) (Ticconi *et al.*, 2001; Varadarajan *et al.*, 2002) manifestando que el Pi es capaz de actuar como un señalizador inicial.

PHR1 es un factor de transcripción con un dominio MYB de unión al ADN y un dominio de dimerización que predice la formación de homodímeros y heterodímeros. Se conoce que PHR1 se une como dímero a una secuencia palindrómica imperfecta (GNATATNC, donde N puede ser A, T, G ó C) conocida como sitio de unión a PHR1 (P1BS, PHR1-binding site) en la región promotora de algunos genes inducidos por deficiencia de fosfato (PSI) (Rubio *et al.*, 2001; Hu y Chu, 2011). La mutante *phr1* presenta una concentración de Pi disminuido en condiciones de suficiencia de Pi y una mínima inducción en la acumulación de antocianinas en respuesta a un déficit de Pi; sugiriendo que PHR1 regula varios genes que están involucrados en captación y transporte de Pi así como en la biosíntesis y acumulación de antocianinas (Bari *et al.*, 2006; Nilsson *et al.*, 2007). Se ha visto que PHR1 podría estar implicada en la interacción entre el suministro de P y el metabolismo de carbono debido a que su mutante también presenta un desacoplamiento en la acumulación de almidón y que es dependiente de un déficit nutrimental por Pi (Nilsson *et al.*, 2007). Los niveles de transcrito de PHR1 y su localización nuclear no cambian de acuerdo al estado de Pi de la planta, a pesar de que PHR1 aparentemente es un regulador positivo de diversos genes inducidos por deficiencia de Pi. Por esto se ha propuesto que una modificación post-traducciona, que es sensible al estado de Pi, altere la actividad de PHR1; una posibilidad es que la actividad de PHR1 se module a través de la fosforilación por cinasas de la familia SnRK que se han implicado en la señalización durante estrés energético (Fragoso *et al.*, 2009; Trejo, 2016). Estudios anteriores han demostrado que la actividad de cinasa de SnRK1 se incrementa en condiciones de deficiencia de Pi (Guerrero, 2012).

Las cinasas de esta familia reconocen sustratos que conservan el dominio XHX+XXS/TXXXH, donde H son aminoácidos hidrofóbicos; +, son aminoácidos de carga positiva y X es cualquier otro aminoácido (Halford *et al.*, 2003). El análisis de diversos sustratos que típicamente se han identificado como enzimas que responden a deficiencia de Pi, mostró que contienen un dominio de reconocimiento a las SnRK's. Ensayos *in vitro* de fosforilación revelaron que la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no fosforilante (np-G3PDH), PHR1 y en menor medida PEPC son fosforiladas por SnRK1 (Trejo, 2016).

En el análisis de la secuencia de PHR1 se identificaron dos sitios potenciales de fosforilación, uno en la Ser11 y otro en la Ser304 que pueden ser reconocidos y fosforilados por cinasas de la familia SnRK. Con el propósito de determinar cuál era el sitio de fosforilación se obtuvieron las proteínas recombinantes con la mutación puntual en la S11A y en la S304A, así como la proteína PHR1 con las dos mutaciones. Los ensayos realizados revelaron que utilizando un extracto parcialmente puro de SnRK1 proveniente de hojas las mutantes S11A y S304A son fosforiladas, indicando que ambos sitios son fosforilados y reconocidos por la cinasa. Interesantemente, la doble mutante no presenta fosforilación, sugiriendo además, que esos son los dos únicos sitios que reconoce la cinasa en PHR1. Resultados obtenidos de la base de datos PhosPhAt, demuestran que PHR1 se ha encontrado fosforilada en tres sitios diferentes a los dos identificados en este trabajo lo que sugiere que otras cinasas, además de SnRK1, están involucradas en su regulación.

Los ensayos de fosforilación utilizando a la proteína recombinante SnRK2.6, indicaron que esta cinasa no fosforila a PHR1. Sin embargo, el hecho de que la autofosforilación de la SnRK2.6 se reduzca en presencia de PHR1 y que esa reducción sea más marcada con las proteínas mutantes, podría sugerir que ambas proteínas interaccionaran y que debido a esa interacción SnRK2.6 inhiba su autofosforilación. Esto requiere de experimentos adicionales que nos permitan contestar esta hipótesis.

Se ha documentado que la expresión de PHR1 a nivel de transcrito y a nivel de proteína no se modifica en condiciones de deficiencia de Pi (Rubio *et al.*, 2001; Bustos *et al.*, 2010), por lo que se asume que su capacidad de detectar situaciones de estrés depende de modificaciones post-traduccionales. Se ha descrito que PHR1 de *Arabidopsis thaliana* es sumoilada por la SUMO E3 ligasa AtSIZ1. La conjugación de las proteínas de la superfamilia SUMO a sustratos específicos pueden tener efectos tanto positivos como negativos en la modulación de la interacción proteína-proteína y proteína-DNA. En el caso particular de PHR1 no hay evidencias directas del efecto de la modificación, pero sí se ha descrito que el mutante en *AtSIZ1*, reduce la inducción de dos genes (*AtIPS1* y *AtRNS1*) controlados por PHR1, lo que sugeriría una modulación positiva (Miura *et al.*, 2005).

El presente trabajo aporta datos importantes sobre nuevas vías de regulación de PHR1 a través de modificaciones post-traduccionales por fosforilación. Se ha descrito que las cinasas de la familia SnRK juegan un papel muy importante en la respuesta a diversos estreses en plantas que conducen, entre otras respuestas, a un ajuste metabólico celular (Baena-González *et al.*, 2008; Fragoso *et al.*, 2009). En *Arabidopsis thaliana*, esta familia de cinasas está compuesta por cerca de 40 proteínas, algunas de las cuáles tienen funciones específicas. La subfamilia de las SnRK1 están involucradas en la respuesta a estrés energético y en el desarrollo normal de las plantas, mientras que las subfamilias SnRK2 y SnRK3 están más especializadas en las respuestas a estreses abióticos como sequía, alta presión osmótica y concentraciones altas de sal (Coello *et al.*, 2011). Nuestros resultados indican, que cinasas de la subfamilia SnRK1 fosforilan en sitios específicos a PHR1, mientras que esta proteína no es reconocida como sustrato por proteínas cinasas de la subfamilia SnRK2.6. Estos datos concuerdan con las funciones establecidas para cada una de estas cinasas. Trabajos a futuro tendrán que definir si hay función diferencial de los dos sitios de fosforilación encontrados para PHR1 y su efecto en la detección del estrés energético promovido por la deficiencia de Pi. Además, será necesario aportar evidencias de la interacción de estas dos proteínas *in planta*.

6.1 Conclusiones

- Cinasas de la familia SnRK1, reconocen y fosforilan la Ser11 y la Ser304 presentes en la secuencia del factor de transcripción PHR1. Lo anterior se confirmó al observar que la doble mutante (S11A S304A) abate la fosforilación.
- La proteína recombinante SnRK2.6 no fosforila al factor de transcripción PHR1.

6.2 Perspectivas

- Determinar la interacción de PHR1 y el complejo de cinasa SnRK1 y la localización subcelular de ésta mediante la técnica de fluorescencia por complementación bimolecular (BiFC).
- Generar plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresen a *Phr1-DM* y determinar si hay un apagamiento en la expresión de genes específicos que son regulados por PHR1.

Bibliografía

- Andersson M., Stridh M., Larsson K., Liljenberg C., Sandelius A. (2003). Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett.* **537**, 128-132.
- Baena-González E., Rolland F., Thevelein J., Sheen J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature.* **448**, 938-942.
- Baena-González E., Sheen J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends. Plant Sci.* **13**, 474-482.
- Bari R., Pant B., Stitt M., Scheible W. (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling in plants. *Plant Physiol.* **141**, 988-999.
- Bradford M. (1976). "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Briat J., Rouached H., Tissot N., Gaymard F., Dubos C. (2015). Integration of P, S, Fe and Zn nutrition signals in *Arabidopsis thaliana*: potential involvement of Phosphate Starvation Response (PHR1). *Front. Plant Sci.* **6**, 290.
- Bustos R., Castrillo G., Linhares F., Puga M., Rubio V., Pérez-Pérez J., Solano R., Leyva A., Paz-Ares J. (2010). A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **6**, e1001102.

- Castillo R. (2014). Expresión de la proteína cinasa SnRK2.6 en plantas de *Arabidopsis thaliana* creciendo en suficiencia y deficiencia de fósforo. Tesis de licenciatura, F.Q., UNAM.
- Chen Z., Nimmo G., Jenkins G., Nimmo H. (2007). bHLH32 modulates several biochemical and morphological processes that respond to Pi starvation in *Arabidopsis*. *Biochem. J.* **405**, 191-198.
- Chiou T., Aung K., Lin S., Wu C., Chiang S., Su C. (2006). Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **18**, 412-421.
- Coello P., Hey S., Halford N. (2011). The sucrose-non fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. *J. Exp. Bot.* **62**, 883-893.
- Coello P., Hirano E., Hey S., Muttucumaru N., Martínez-Barajas E., Parry M., Halford N. (2012). Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase 1 (SnRK1) in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. *J. Exp. Bot.* **63**, 913-924.
- Dong J., Chen C., Chen Z. (2003). Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene super family during plant defense response. *Plant Mol. Biol.* **51**, 21-37.
- Fang Z., Shao C., Meng Y., Wu P., Chen M. (2009). Phosphate signaling in *Arabidopsis* and *Oryza sativa*. *Plant Sci.* **176**, 170-180.
- Fragoso S., Espíndola L., Páez-Valencia J., Gamboa A., Camacho Y., Martínez-Barajas E., Coello P. (2009). SnRK1 isoforms AKIN10 and AKIN11 are differentially regulated in *Arabidopsis* plants under phosphate starvation. *Plant Physiol.* **149**, 1909-1916.

- Fujii H., Chiou T., Lin S., Aung K., Zhu J. (2005). A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **15**, 2038-2043.
- Ghillebert R., Swinnen E., Wen J., Vandesteene L., Ramon M., Norga K., Rolland F., Winderickx J. (2011). The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *The FEBS J.* **278**, 3978-3990.
- Guerrero J. (2012). Identificación de complejos formados por la SnRK1 durante la deficiencia de fósforo en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura, F.Q., UNAM.
- Guo B., Jin Y., Wussier C., Blancaflor E., Motes C., Versaw W. (2008). Functional analysis of the *Arabidopsis* PHT4 family of intracellular phosphate transporters. *New Phytol.* **177**, 889-898.
- Halford N., Bouly J., Thomas M. (2000). SNF1-related protein kinases (SnRK's) – regulators at the heart of the control of carbon metabolism and partitioning. *Adv. Bot. Res.* **32**, 405-434.
- Halford N., Hey S. (2009). Snf1-related protein kinase (SnRK's) act within an intricate network that links metabolic and stress signaling in plants. *Biochem. J.* **419**, 247-259.
- Halford N., Hey S., Jhurreea D., Laurie S., McKibbin R., Paul M., Zhang Y. (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J. Exp. Bot.* **54**, 467-475.
- Hammond J., White P. (2008). Sucrose transport in the phloema: integrating root responses to phosphorus starvation. *J. Exp. Bot.* **59**, 93-109.
- Hardie D. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 774-785.

- Hu B., Chu C. (2011). Phosphate starvation signaling in rice. *Plant Signal. Behav.* **6**, 927-929.
- Kobayashi K., Masuda T., Takamiya K., Ohta H. (2006). Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross talk. *Plant J.* **47**, 238-248.
- Lin S., Chiang S., Lin W., Chen J., Tseng C., Wu P., Chiou T. (2008). Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol.* **147**, 732-746.
- Liu J., Ishitani M., Halfter U., Kim C., Zhu J. (2000). The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 3730-3734.
- Marschner H. (1995). Mineral activation of higher plants. *Acad. Press London.*
- Miura K., Rus A., Sharkhuu A., Yokoi S., Karthikeyan A., Raghothama K., Baek D., Koo Y., Jin J., Bressan R., Yu D., Hasegawa P. (2005). The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 7760-7765.
- Mizoguchi M., Umezawa T., Nakashima K., Kidokoro S., Takasaki H., Fujita Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2010). Two closely related subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression. *Plant Cell. Physiol.* **51**, 842-847.
- Nilsson L., Müller R., Nielsen T. (2007). Increased expression of the MYB-related transcription factor, *PHR1*, lead to enhanced phosphate uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell. Environ.* **30**, 1499-1512.

- Nilsson L., Müller R., Nielsen T. (2010). Dissecting the plant transcriptome and the regulatory responses to phosphate deprivation. *Physiol. Plant.* **139**, 129-143.
- Nunes C., O'Hara L., Primavesi L., Delatte T., Schlupepmann H., Somsen G. (2013). The trehalose 6-phosphate/SnRK1 signaling pathway primes growth recovery following relief of sink limitation. *Plant Physiol.* **162**, 1720-1732.
- Nunes C., Primavesi L., Patel M., Martínez-Barajas E., Powers S., Sagar R., Feveireiro P., Davies B., Paul M. (2013). Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol. Biochem.* **63**, 89-98.
- Panigrahy M., Nageswara D., Sarla N. (2009). Molecular mechanisms in response to phosphate starvation in rice. *Biotechnol. Adv.* **27**, 389-397.
- Plaxton W., Tran H. (2011). Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiol.* **156**, 1006-1015.
- Poirier Y., Bucher M. (2002). Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. *The Arabidopsis Book*. 1-35.
- Polge C., Thomas M. (2007). SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends. Plant Sci.* **12**, 20-28.
- Raghothama K. (2000). Phosphate acquisition. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **50**, 665-693.
- Raghothama K. (2005). Phosphate acquisition. *Plant Soil.* **274**, 37-49.
- Rubio V., Linhares F., Solano R., Martín A., Iglesias J., Leyva A., Paz-Ares J. (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* **15**, 2122-2133.

- Shin H., Dewbre G., Harrison M. (2004). Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environment. *Plant J.* **39**, 629-642.
- Smalle J., Vierstra R. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Ann. Rev. Plant Biol.* **55**, 555-590.
- Smith A., Stitt M. (2007). Coordination of carbon supply and plant growth. *Plant Cell. Environ.* **30**, 1126-1149.
- Stefanovic A., Arpat A., Bligny R., Gout E., Vidoudez C., Bensimon M., Poirier Y. (2011). Over-expression of *PHO1* in *Arabidopsis* leaves its role in mediating phosphate efflux. *Plant J.* **66**, 689-699.
- Stitt M. (1998). Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: An enigmatic alternative to ATP. *Bot. Acta.* **111**, 167-175.
- Thibaud M., Arrighi J., Bayle V., Chiarenza S., Creff A., Bustos R., Paz-Ares J., Poirier Y., Nussaume L. (2010). Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **64**, 775-789.
- Ticconi C., Delatorre C., Abel S. (2001). Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **127**, 963-972.
- Trejo R. (2016). Identificación de proteínas blanco del complejo enzimático SnRK1 de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura, F.Q., UNAM.
- Vance C., Uhde-Stone C., Allan D. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol.* **157**, 423-447.

- Varadarajan D., Karthikeyan A., Matilda P., Raghothama K. (2002). Phosphite, an analog of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation. *Plant Physiol.* **129**, 1232-1240.
- Versaw W., Harrison M. (2002). A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell.* **14**, 1751-1766.
- Wang H., Wan A., Hsu C., Lee K., Yu S., Jauh G. (2007). Transcriptomic adaptations in rice suspension cells under sucrose starvation. *Plant Mol. Biol.* **63**, 441-463.
- Wang Y., Ribot C., Rezzonico E., Poirier Y. (2004). Structure and expression profile of the *Arabidopsis PHO1* gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis. *Plant Physiol.* **135**, 1-12.
- Wykoff D., Grossman A., Weeks D., Usuda H., Shimogawara K. (1999). Psr1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 15336-15341.
- Yoshida R., Hobo T., Ichimura K., Mizoguchi T., Takahashi F., Aronso J., Ecker J., Shinozaki K. (2002). ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell. Physiol.* **43**, 1473-1483.
- Yuan H., Dong L. (2008). Signaling components involved in plant responses to phosphate starvation. *J. Integrat. Plant Biol.* **50**, 849-859.

Anexo I: Estrategia de mutagénesis

– Mutante *Phr1-1*

Se diseñó un oligonucleótido en dirección forward (*MPhr1-1*) que inserta la mutación (S11A), utilizando el oligonucleótido rev wt y partiendo del cDNA molde de *PHR1* (wt) mediante PCR, se amplificó el cDNA de la mutante *Phr1-1* (Figura 26).

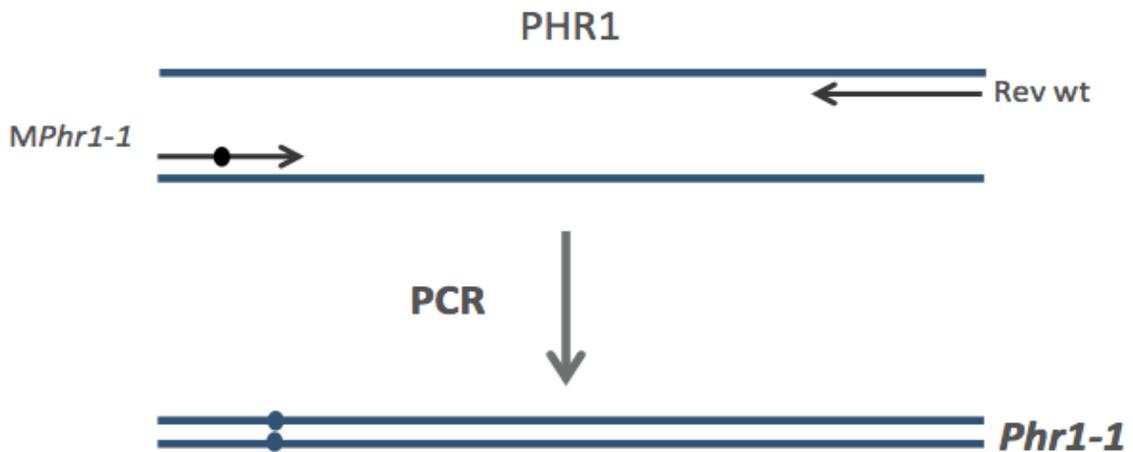


Figura 26. Estrategia de mutagénesis llevada a cabo para obtener el cDNA de *Phr1-1*.

– Mutante *Phr1-2*

Debido a la posición del codón que codifica para el aminoácido a mutar hacia el extremo carboxilo, fue necesario diseñar dos oligonucleótidos uno denominado Midantisense, en dirección reverse (*MAPhr1-2*) y otro Midsense en dirección forward (*MSPhr1-2*), ambos son complementarios e insertan la mutación (S304A), utilizando los oligonucleótidos fwd wt y rev wt respectivamente y partiendo del cDNA molde del wt mediante PCR, se obtuvieron dos fragmentos, uno de 900 pb y otro de 350 pb (Figura 27).

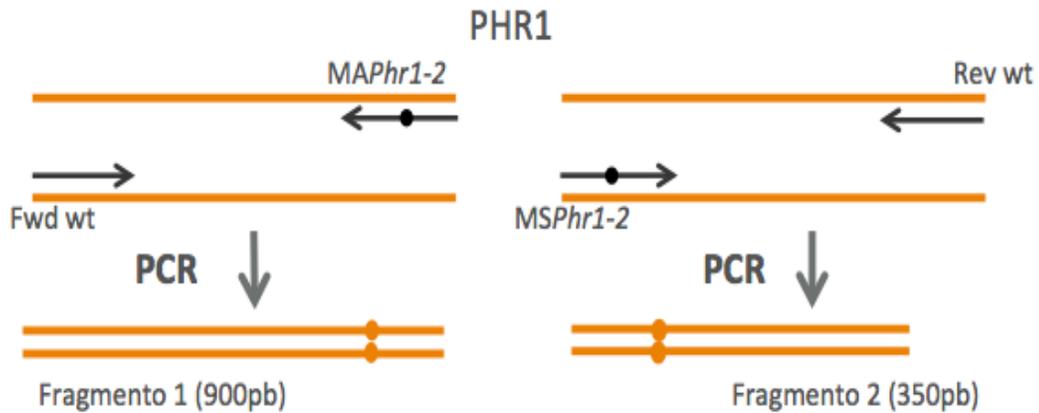


Figura 27. Amplificación de dos fragmentos de diferente extensión.

Estos dos fragmentos se desnaturalizaron para permitir el alineamiento de las cadenas, y posteriormente, con ayuda de la Taq polimerasa la cadena se elonga formando una doble cadena que ya tiene la mutación. Agregando los oligonucleótidos para la wt y mediante PCR, se amplificó el cDNA de la mutante *Phr1-2* (Figura 28).

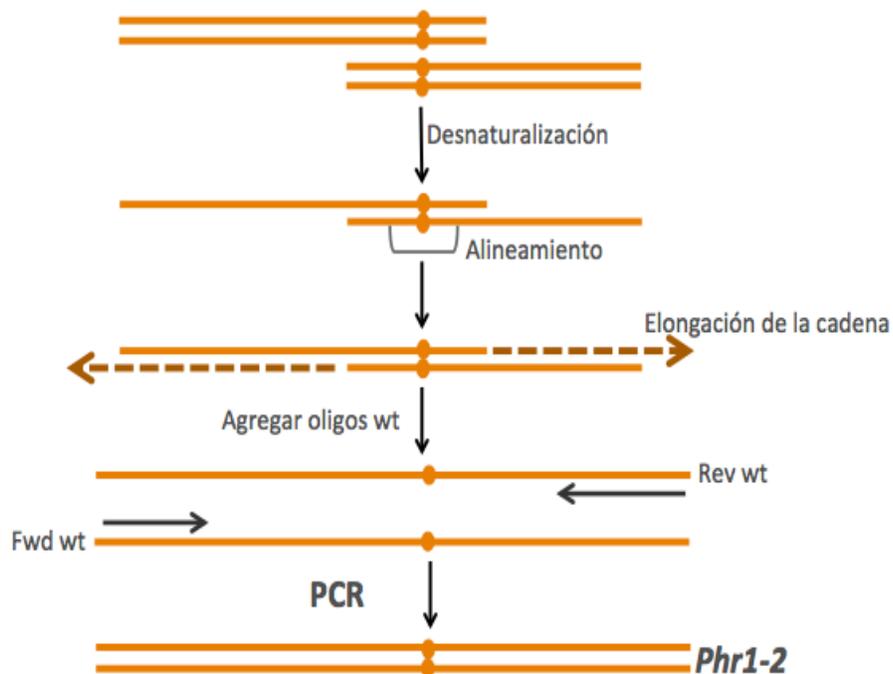


Figura 28. Estrategia de mutagénesis llevada a cabo para obtener el cDNA de *Phr1-2*.

– Doble mutante

Se partió del cDNA molde de *Phr1-2* que tiene una mutación puntual. Utilizando el oligonucleótido *MPhr1-1* y el rev wt mediante PCR, se amplificó el cDNA de la doble mutante (*Phr1-DM*) (Figura 29).

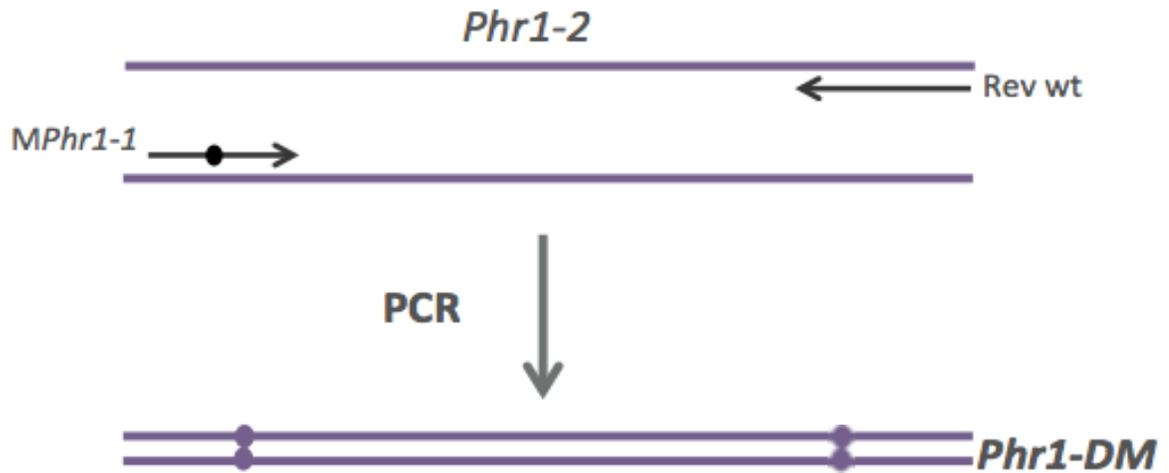


Figura 29. Estrategia de mutagénesis llevada a cabo para obtener el cDNA de *Phr1-DM*.

Anexo II: Secuencia de las construcciones PHR1 y mutantes

Secuencia PHR1, sin cambios con respecto a la base de datos de TAIR; en rojo, etiqueta 6 xHis en ambos extremos de la proteína; en azul, secuencia del oligonucleótido fwd wt; en verde, secuencia del oligonucleótido rev wt.

TAIR	#####	0
PHR1	ATGGGCAGCAGC CATCATCATCATCAC AGCAGCGGCTGGTCCGCGCGGAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCCG M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M A S M T G G Q Q M G R D P	102
TAIR	-----ATGGAGGCTCGTCCAGTTCATAGATCAGGTTTCGAGAGACCTCACAGCACTTCTCAATCCCATCTACACAAAACCTTACCAGTAGAAGATAGT #####	96
PHR1	AATTCGATGGAGGCTCGTCCAGTTCAT AGATCAGGTTTCGAGAGACCTCACAGCACTTCTCAATCCCATCTACACAAAACCTTACCAGTAGAAGATAGT N S M E A R P V H R S G S R D L T R T S S I P S T Q K P S P V E D S	204
TAIR	F M R S D N N S Q L M S R P L G Q T Y H L L S S S N G G A V G H I C	198
PHR1	TTCATGAGATCAGATAACACAGTCACTTAATGTCTAGACCATTAGGACAAACCTACCATTACTTTCATCTAGTAAACGGTGGAGCTGTGGACATATATGT F M R S D N N S Q L M S R P L G Q T Y H L L S S S N G G A V G H I C	306
TAIR	S S S S S G F A T N L H Y S T M V S H E K Q Q H Y T G S S S N N A V	300
PHR1	TCTTCTCATCATCTGGTTTTCACCAACTCTCATTACTCAACTATGTTATCTCATGAGAAACAACAACACTACACAGGAAGCAGCAGTAAATATGCTGTG S S S S S G F A T N L H Y S T M V S H E K Q Q H Y T G S S S N N A V	408
TAIR	Q T P S N N D S A W C H D S L P G G F L D F H E T N P A I Q N N C Q	402
PHR1	CAGACACCAAGCAACAACGATAGTCTGGTCTCATGATTTCATGCGCAGGAGGTTTCTTGACTTCCATGAAACCAACCGGGCATTCAAACAACCTGCAG Q T P S N N D S A W C H D S L P G G F L D F H E T N P A I Q N N C Q	510
TAIR	I E D G G I A A A F D D I Q K R S D W H E W A D H L I T D D D P L M	504
PHR1	ATTGAGGATGGTGGCATTGCGGCTGCTTTGATGACATCAAAGCAAGTGAATGGCATGAATGGGCTGACCATTGATCAGTATGATGATCCTTTGATG I E D G G I A A A F D D I Q K R S D W H E W A D H L I T D D D P L M	612
TAIR	S T N W N D L L L E T N S N S D S K D Q K T L Q I P Q P Q I V Q Q Q	606
PHR1	TCTACTAAGTGAATGATCTCTTGCTTGAACAAAATCCAATTCAGATTCAAAGGACCAAGAGACACTGCAAAATCCGCAACCTCAGATTGTTACAGCAGAA S T N W N D L L L E T N S N S D S K D Q K T L Q I P Q P Q I V Q Q Q	714
TAIR	P S P S V E L R P V S T T S S N S N N G T G K A R M R W T P E L H E	708
PHR1	CCTTCCGCTGTTGGAAATGCGACCTGTTAGCACACATCTTCAAACAGCAATAACCGAAGCGGCAAGGCAGCAATGCGTTGGAGCCAGAGCTTACAGAG P S P S V E L R P V S T T S S N S N N G T G K A R M R W T P E L H E	816
TAIR	A F V E A V N S L G C S E R A T P K G V L K I M K V E G L T I Y H V	810
PHR1	GCTTTTGTGAGGCTGCAACAGTCTTGGCGGTAGTAAAGAGCTACTCTAAAGGGTACTGAAGATTGAAGTTGAAGGCTGACTATATATATATGTT A F V E A V N S L G C S E R A T P K G V L K I M K V E G L T I Y H V	918
TAIR	K S H L Q K Y R T A R Y R P E P S E T G S P E R K L T P L E H I T S	912
PHR1	AAAAGCCATTCAGAAAATATAGGACAGCTAGATATCGGCCAGAACCATCAGAACTGGTTTCGCGAGAAAGGAAGTTGACACCGCTTGAACATATAACATCT K S H L Q K Y R T A R Y R P E P S E T G S P E R K L T P L E H I T S	1020
TAIR	L D L K G G I G I T E A L R L Q M E V Q K Q L H E Q L E I Q R N L O	1014
PHR1	CCTGATTGAAAGTGGGATAGGTATTACAGAGGCTTACGACTTCAGATGGAAGTACAGAAGCAACTCCATGAGCAGCTCGAGATTCAAAGAACTGGAA L D L K G G I G I T E A L R L Q M E V Q K Q L H E Q L E I Q R N L O	1122
TAIR	L R I E A G A Q G K Y L Q M M F E K Q N S G L T K G T A S T S D S A A K	1116
PHR1	CTCCGAATAAGAAGCAAGGCAAGTACCTGCAATGATGTTTCGAGAAGCAAACTCTGGTCTTACCAAAGGACAGGCTCAACATTCAGATCCGCGAGCAAA L R I E A G A Q G K Y L Q M M F E K Q N S G L T K G T A S T S D S A A K	1224
TAIR	S E Q E D K K T A D S K E V P E E E T R K C E E L E S P Q P K R P K	1218
PHR1	TCTGAACAAGACAAGAAGACTGCTGATTTCGAAGGAGGTTCCAGAGGAAGAAACCGAGAAATGTGAGGAAGTGAAGTTTCCACAGCCAAAGCGTCCCAAA S E Q E D K K T A D S K E V P E E E T R K C E E L E S P Q P K R P K	1326
TAIR	I D N * 1230	
PHR1	ATCGATAAT-----TGA ##### ATCGATAAT AGCTTGGCGCGCACTCGAG CACCACCACCACC ACTGA 1376 I D N K L A A A L E H H H H H H *	

Secuencia *Phr1-1*, resalta a la vista la mutación S11A; en rojo, etiqueta 6 xHis en ambos extremos de la proteína; en anaranjado, secuencia del oligonucleótido *MPhr1-1*; en verde, secuencia del oligonucleótido rev wt.

```

TAIR ----- 0
Phr1-1 ##### 102
M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H M A S M T G G Q Q M G R D P

M E A R P V H R S G S R D L T R T S S I P S T Q K P S P V E D S
TAIR -----ATGGAGGCTCGTCCAGTTCATAGATCAGGTCGAGAGACCTCACAGCCTCTTCTCAATCCCCTACACAAAAACCTTCACCAGTAGAAGATAGT 96
Phr1-1 AATTCGATGGAGGCTCGTCCAGTTCATAGATCAGGTCGAGAGACCTCACAGCCTCTTCTCAATCCCCTACACAAAAACCTTCACCAGTAGAAGATAGT 204
N S H E A R P V H R S G A R D L T R T S S I P S T Q K P S P V E D S

F M R S D N N S Q L M S R P L G Q T Y H L L S S S N G G A V G H I C
TAIR -----TTCATGAGATCAGATAACAACAGTCAGTTAATGCTAGACCATTAGGACAAACCTACCATTACTTTCATCTAGTAACGGTGGAGCTGTTGGACATATATGT 198
Phr1-1 TTCATGAGATCAGATAACAACAGTCAGTTAATGCTAGACCATTAGGACAAACCTACCATTACTTTCATCTAGTAACGGTGGAGCTGTTGGACATATATGT 306
F M R S D N N S Q L M S R P L G Q T Y H L L S S S N G G A V G H I C

S S S S S G F A T N L H Y S T M V S H E K Q Q H Y T G S S S N N A V
TAIR -----TCTTCTTCATCATCTGGTTTTGCAACCAATCTCCATTACTCAACTATGGTATCTCATGAGAAAACAACAACACTACACAGGAAGCAGCAGTAATAATGCTGTG 300
Phr1-1 TCTTCTTCATCATCTGGTTTTGCAACCAATCTCCATTACTCAACTATGGTATCTCATGAGAAAACAACAACACTACACAGGAAGCAGCAGTAATAATGCTGTG 408
S S S S S G F A T N L H Y S T M V S H E K Q Q H Y T G S S S N N A V

Q T P S N N D S A W C H D S L P G G F L D F H E T N P A I Q N N C Q
TAIR -----CAGACACCAAGCAACAACGATAGTGGTGTGTCATGATTCATTGCGAGGAGGGTTCTTGGACTTCCATGAAACCAACCCGGCGATTCAAAAACAACGTGCG 402
Phr1-1 CAGACACCAAGCAACAACGATAGTGGTGTGTCATGATTCATTGCGAGGAGGGTTCTTGGACTTCCATGAAACCAACCCGGCGATTCAAAAACAACGTGCG 510
Q T P S N N D S A W C H D S L P G G F L D F H E T N P A I Q N N C Q

I E D G G I A A A F D D I Q K R S D W H E W A D H L I T D D D D P L M
TAIR -----ATTGAGATGGTGGCATTGCGGCTGCTTTTGTGACATTCAAAAACGAAGTATTGGCATGAATGGGCTGACCATTGATCACTGATGATGATCCTTTGATG 504
Phr1-1 ATTGAGATGGTGGCATTGCGGCTGCTTTTGTGACATTCAAAAACGAAGTATTGGCATGAATGGGCTGACCATTGATCACTGATGATGATCCTTTGATG 612
I E D G G I A A A F D D I Q K R S D W H E W A D H L I T D D D D P L M

S T N W N D L L L E T N S N S D S K D Q K T L Q I P Q P Q I V Q Q Q
TAIR -----TCTACTAATCGAATGATCTCTTGGCTTGAACAATCCAAATTCAGATTCAAAGGACCAGAAGACTGCAAAATCCGCAACCTCAGATTTGTCAGCAGCAA 606
Phr1-1 TCTACTAATCGAATGATCTCTTGGCTTGAACAATCCAAATTCAGATTCAAAGGACCAGAAGACTGCAAAATCCGCAACCTCAGATTTGTCAGCAGCAA 714
S T N W N D L L L E T N S N S D S K D Q K T L Q I P Q P Q I V Q Q Q

P S P S V E L R P V S T T S S N S N N G T G K A R M R W T P E L H E
TAIR -----CCTTCTCCGCTCTGGAATTGCGACCTGTTAGCACAACTCTTCAAAACGAATAAACGGAAACGGGCAAGGCAGCAATGCGTTGGACGCCAGAGCTTCACGAG 708
Phr1-1 CCTTCTCCGCTCTGGAATTGCGACCTGTTAGCACAACTCTTCAAAACGAATAAACGGAAACGGGCAAGGCAGCAATGCGTTGGACGCCAGAGCTTCACGAG 816
P S P S V E L R P V S T T S S N S N N G T G K A R M R W T P E L H E

A F V E A V N S L G G S E R A T P K G V L K I M K V E G L T I Y H V
TAIR -----GCTTTTGTGAGGCTGTCAACAGTCTTGGCGTAGTGAAGAGCTACTCTTAAAGGGTACTGAAGATTATGAAAGTTGAAGGCTTGACTATATATCATGTT 810
Phr1-1 GCTTTTGTGAGGCTGTCAACAGTCTTGGCGTAGTGAAGAGCTACTCTTAAAGGGTACTGAAGATTATGAAAGTTGAAGGCTTGACTATATATCATGTT 918
A F V E A V N S L G G S E R A T P K G V L K I M K V E G L T I Y H V

K S H L Q K Y R T A R Y R P E P S E T G S P E R K L T P L E H I T S
TAIR -----AAAAGCCATTTACAGAAATATAGGACAGCTAGATATCGGCCAGAACCATCAGAAACTGGTTCGCCAGAAAGGAAGTTGACACCGCTTGAACATATAACATCT 912
Phr1-1 AAAAGCCATTTACAGAAATATAGGACAGCTAGATATCGGCCAGAACCATCAGAAACTGGTTCGCCAGAAAGGAAGTTGACACCGCTTGAACATATAACATCT 1020
K S H L Q K Y R T A R Y R P E P S E T G S P E R K L T P L E H I T S

L D L K G G I G I T E A L R L Q M E V Q K Q L H E Q L E I Q R N L Q
TAIR -----CTTGATTTGAAAGGTTGGATAGGTATTACAGAGGCTCTACGACTTCAGATGGAAGTACAGAAGCAACTCCATGAGCAGCTCGAGATTCAAAGAACTGCAA 1014
Phr1-1 CTTGATTTGAAAGGTTGGATAGGTATTACAGAGGCTCTACGACTTCAGATGGAAGTACAGAAGCAACTCCATGAGCAGCTCGAGATTCAAAGAACTGCAA 1122
L D L K G G I G I T E A L R L Q M E V Q K Q L H E Q L E I Q R N L Q

L R I E E Q G K Y L Q M M F E K O N S G L T K G T A S T S D S A A K
TAIR -----CTCCGAATAGAAGAACAGGCAAGTACCTGCAAAATGATGTTGAGAAAGCAAAACTCTGGTCTTACCAAGGGACAGCCTCAACATCAGATTCCCGAGCCAAA 1116
Phr1-1 CTCCGAATAGAAGAACAGGCAAGTACCTGCAAAATGATGTTGAGAAAGCAAAACTCTGGTCTTACCAAGGGACAGCCTCAACATCAGATTCCCGAGCCAAA 1224
L R I E E Q G K Y L Q M M F E K O N S G L T K G T A S T S D S A A K

S E Q E D K K T A D S K E V P E E E T R K C E E L E S P Q P K R P K
TAIR -----TCTGAAACGAAGACAGAAGACTGCTGATTTCGAAGGAGTTCCAGAAGAAACAGGAAATGTGAGGAAGTGAAGTCTCCACAGCCAAAGCGTCCCAAAA 1218
Phr1-1 TCTGAAACGAAGACAGAAGACTGCTGATTTCGAAGGAGTTCCAGAAGAAACAGGAAATGTGAGGAAGTGAAGTCTCCACAGCCAAAGCGTCCCAAAA 1326
S E Q E D K K T A D S K E V P E E E T R K C E E L E S P Q P K R P K

I D N *
TAIR ATCGATAAT-----TGA 1230
Phr1-1 ATCGATAATAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA 1376
I D N K L A A A L E H H H H H H *

```

Secuencia *Phr1-2*, resalta a la vista la mutación S304A; en rojo, etiqueta 6 xHis en ambos extremos de la proteína; en azul, secuencia del oligonucleótido fwd wt; en morado, secuencia del oligonucleótido *MSPhr1-2* y *MAPhr1-2*; en verde, secuencia del oligonucleótido rev wt.

TAIR	#####	0
<i>Phr1-2</i>	ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGCCCTGGTGCCTGGCGGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTGGTGACAGCAAATGGTTCGGGATCCG M G S S H H H H H H S S G L V F R G S H M A S M T G G Q Q M G R D P	102
TAIR	-----ATGGAGGCTCGTCCAGTTCATAGATCAGGTCGAGAGACCTCACAGCACTTCTCAATCCCATCTACACAAAAACCTTCACCCAGTAGAAGATAGT #####	96
<i>Phr1-2</i>	AATTTCGATGGAGGCTCGTCCAGTTCATAGATCAGGTCGAGAGACCTCACAGCACTTCTCAATCCCATCTACACAAAAACCTTCACCCAGTAGAAGATAGT N S M E A R P V H R S G S R D L T R T S S I P S T Q K P S P V E D S	204
TAIR	F M R S D N N S Q L M S R P L G Q T Y H L L S S S N G G A V G H I C	198
<i>Phr1-2</i>	TTTCATGAGATCAGATAACAACAGTCAGTTAATGCTAGACCATTAGGACAAACCTACCATTACTTTTCATCTAGTAACGGTGGAGCTGTTGGACATATATGT TTTCATGAGATCAGATAACAACAGTCAGTTAATGCTAGACCATTAGGACAAACCTACCATTACTTTTCATCTAGTAACGGTGGAGCTGTTGGACATATATGT F M R S D N N S Q L M S R P L G Q T Y H L L S S S N G G A V G H I C	306
TAIR	S S S S S G F A T N L H Y S T M V S H E K Q Q H Y T G S S S N N A V	300
<i>Phr1-2</i>	TCTTCTCATCATCTGGTTTGAACAACATCCATTACTCAACTATGGTATCTCATGAGAAAAACAACAACACACAGGAGGAGCAGTAATAATGCTGTG TCTTCTCATCATCTGGTTTGAACAACATCCATTACTCAACTATGGTATCTCATGAGAAAAACAACAACACACAGGAGGAGCAGTAATAATGCTGTG S S S S S G F A T N L H Y S T M V S H E K Q Q H Y T G S S S N N A V	408
TAIR	Q T P S N N D S A W C H D S L P G G F L D F H E T N P A I Q N N C Q	402
<i>Phr1-2</i>	CAGACCAACAGCAACAGTAGTCTGGTGTGATTCATGAGAAAAACAACAACACACAGGAGGAGCAGTAATAATGCTGTG CAGACCAACAGCAACAGTAGTCTGGTGTGATTCATGAGAAAAACAACAACACACAGGAGGAGCAGTAATAATGCTGTG Q T P S N N D S A W C H D S L P G G F L D F H E T N P A I Q N N C Q	510
TAIR	I E D G G I A A A F D D I Q K R S D W H E W A D H L I T D D D D P L M	504
<i>Phr1-2</i>	ATTGAGGATGGTGGCATTGCGGCTGCTTTGATGACATCAAAAAGCGAAGTATTGGCATGAATGGGCTGACCATTGATCACTGATGATGATCCCTTTGATG ATTGAGGATGGTGGCATTGCGGCTGCTTTGATGACATCAAAAAGCGAAGTATTGGCATGAATGGGCTGACCATTGATCACTGATGATGATCCCTTTGATG I E D G G I A A A F D D I Q K R S D W H E W A D H L I T D D D D P L M	612
TAIR	S T N W N D L L L E T N S N S D S K D Q K T L Q I P Q P Q I V Q Q Q	606
<i>Phr1-2</i>	TCTACTAACGGAATGATCTTGGTTGAAAAAATCCAATTCAGATTCAAAAGCAGAGAAGACTGCAAAATCCCGAACCTCAGATTGTTTCAGCAGCAA TCTACTAACGGAATGATCTTGGTTGAAAAAATCCAATTCAGATTCAAAAGCAGAGAAGACTGCAAAATCCCGAACCTCAGATTGTTTCAGCAGCAA S T N W N D L L L E T N S N S D S K D Q K T L Q I P Q P Q I V Q Q Q	714
TAIR	P S P S V E L R P V S T T S S N S N N G T G K A R M R W T P E L H E	708
<i>Phr1-2</i>	CCTTCTCCGCTGTGGAATTGCGACCTGTAGCACAACATCTTCAAACAGCAATAACGGAAACGGGCAAGGCACGAATGCGTTGGACGCCAGAGCTTCACGAG CCTTCTCCGCTGTGGAATTGCGACCTGTAGCACAACATCTTCAAACAGCAATAACGGAAACGGGCAAGGCACGAATGCGTTGGACGCCAGAGCTTCACGAG P S P S V E L R P V S T T S S N S N N G T G K A R M R W T P E L H E	816
TAIR	A F V E A V N S L G G S E R A T P K G V L K I M K V E G L T I Y H V	810
<i>Phr1-2</i>	GCTTTTGTGAGGCTGTCAACAGTCTTGGCGGTAGTGAAGAGCTACTCCTAAAGGGGTACTGAAGATTATGAAAGTTGAAGGTTGACTATATATCATGTT GCTTTTGTGAGGCTGTCAACAGTCTTGGCGGTAGTGAAGAGCTACTCCTAAAGGGGTACTGAAGATTATGAAAGTTGAAGGTTGACTATATATCATGTT A F V E A V N S L G G S E R A T P K G V L K I M K V E G L T I Y H V	918
TAIR	K S H L Q K Y R T A R Y R P E P S E T G S P E R K L T P L E H I T S	912
<i>Phr1-2</i>	AAAAGCCATTACAGAAATATAGGACAGCTAGATATCGCCAGAACCATCAGAAACTGGTTCGCCAGAAGGAAGTTGACACCGCTTGAACATATAACATCT AAAAGCCATTACAGAAATATAGGACAGCTAGATATCGCCAGAACCATCAGAAACTGGTTCGCCAGAAGGAAGTTGACAACCGCTTGAACATATAACAGCC K S H L Q K Y R T A R Y R P E P S E T G S P E R K L T P L E H I T A	1020
TAIR	L D L K G G I G I T E A L R L Q M E V Q K Q L H E Q L E I Q R N L Q	1014
<i>Phr1-2</i>	CTTGATTGAAAGTGGGATAGGATTACAGAGGCTTACGACTTCAGATGGAAGTACAGAAGCAACTCCATGAGCAGCTCGAGATTCAAAGAACTGGCAA CTTGATTGAAAGTGGGATAGGATTACAGAGGCTTACGACTTCAGATGGAAGTACAGAAGCAACTCCATGAGCAGCTCGAGATTCAAAGAACTGGCAA L D L K G G I G I T E A L R L Q M E V Q K Q L H E Q L E I Q R N L Q	1122
TAIR	L R I E E Q G K Y L Q M M F E K Q N S G L T K G T A S T S D S A A K	1116
<i>Phr1-2</i>	CTCCGAATAGAAGAACAGGCAAGTACCTGCAAAATGATGTCGAGAAAGCAAAACTCTGGTCTTACCAAAGGGACAGCCTCAACATCGAGTTCGCCAGCAAA CTCCGAATAGAAGAACAGGCAAGTACCTGCAAAATGATGTCGAGAAAGCAAAACTCTGGTCTTACCAAAGGGACAGCCTCAACATCGAGTTCGCCAGCAAA L R I E E Q G K Y L Q M M F E K Q N S G L T K G T A S T S D S A A K	1224
TAIR	S E Q E D K K T A D S K E V P E E E T R K C E E L E S P Q P K R P K	1218
<i>Phr1-2</i>	TCTGAACAAGAAGACAGGAGCTGCTGATTGAAAGGAGTTCGAGAAAGCAAAACTCTGGTCTTACCAAAGGGACAGCCTCAACATCGAGTTCGCCAGCAAA TCTGAACAAGAAGACAGGAGCTGCTGATTGAAAGGAGTTCGAGAAAGCAAAACTCTGGTCTTACCAAAGGGACAGCCTCAACATCGAGTTCGCCAGCAAA S E Q E D K K T A D S K E V P E E E T R K C E E L E S P Q P K R P K	1326
TAIR	I D N	1230
<i>Phr1-2</i>	ATCGATAAT-----TGA ##### ATCGATAATAGCTTGGCGCCCACTCGAGCACCACCACCACCACCTGA I D N K L A A A L E H H H H H H *	1376

