



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**FOSFORILACIÓN DE LA ENZIMA DESPROPORCIONADORA DPE1
POR CINASAS DE LA FAMILIA SNRK1.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

GABRIELA MORALES SOLANA.



CD.MX

2018



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: Martha Patricia Coello Coutiño.

SECRETARIO: Profesor: Oscar Hernández Meléndez.

1er. SUPLENTE: Profesor: Carmina Montiel Pacheco.

2° SUPLENTE: Profesor: Felix Morales Flores.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, LABORATORIO 105. CONJUNTO E, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

PATRICIA COELLO COUTIÑO

SUPERVISOR TÉCNICO:

ANA RUIZ GAYOSO

SUSTENTANTE:

GABRIELA MORALES SOLANA

Agradecimientos.

Esta tesis de licenciatura fue realizada gracias a los proyectos de financiamiento PAPIIT IN216216, PAIP 5000-9126 y CONACyT 252001 y 252123.

ÍNDICE.

1. Resumen.....	3
2. Introducción.....	4
Estrés y energía.....	4
Familia SNF1/AMPK/ SnRK1.....	5
Complejo SnRK1.....	9
SnRK1 y el metabolismo de carbohidratos.....	10
Almidón: carbohidrato de reserva en plantas.....	12
Degradación de almidón.....	13
Enzima desproporcionadora (DPE1).....	14
DPE1 como posible blanco de SnRK1.....	16
3. Antecedentes inmediatos.....	17
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivo general.....	20
6. Objetivos particulares:.....	20
7. Metodología.....	21
Ensayo de restricción de pGEM T Easy DPE1 y pET28b.....	21
Electroforesis en gel de agarosa.....	22
Purificación del cDNA correspondiente a DPE1 y del vector de expresión pET28b del gel de agarosa.....	23
Ligación del cDNA de DPE1 al vector de expresión pET28b.....	23
Transformación en células de E.coli DH5- α por choque térmico.....	24
Purificación del plásmido.....	24
Ensayo de restricción para confirmar la ligación de pET28b-DPE1.....	24
Transformación en E. coli BL21-RIL por choque térmico.....	25
Determinación de las condiciones óptimas de sobreexpresión de la proteína recombinante DPE1.....	25
Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE.....	26
Detección de proteínas por Western-Blot.....	27

Purificación de la proteína recombinante DPE1 a partir de cuerpos de inclusión.....	28
Cuantificación de la proteína por método de Bradford.....	28
Ensayos de fosforilación.....	29
Marca Radioactiva.....	29
Phos-Tag.....	30
8. Resultados.....	31
Ensayo de restricción de pGEM-DPE1 y pET28b.....	31
Ligación de pET28b-DPE1.....	32
Determinación de las condiciones óptimas de sobreexpresión.....	34
Purificación de la proteína recombinante.....	35
Ensayo de fosforilación.....	38
9. Discusión y conclusiones.....	41
10. Conclusiones.....	44
11. Perspectivas.....	44
12. Bibliografía.....	45
13. ANEXOS.....	44

1. Resumen.

El almidón es una de las moléculas de reserva más importantes del reino vegetal. En este trabajo nos enfocamos en la enzima desproporcionadora del almidón (DPE1) involucrada directamente en la de degradación, que transfiere grupos glucosilos a una cadena mayor de glucanos permitiendo que la molécula este disponible para las enzimas hidrolíticas. Los mecanismos moleculares que regulan la degradación del almidón son muy variados y algunos de ellos incluyen la modificación post-traducciona de enzimas a través de la fosforilación por parte de proteínas cinasas. En plantas existen varias familias de proteínas cinasas que regulan la respuesta a factores medio-ambientales cambiantes, entre ellas se encuentra la familia de cinasas SnRK1. Se ha documentado, que mutantes específicos de las subunidades catalíticas alteran su metabolismo y en particular un proceso que se ve comprometido es la degradación del almidón (Baena-Gonzalez *et al.*, 2009; Fragoso *et al.*, 2010). Mediante un análisis *in silico* se han identificado sitios potenciales de fosforilación en diferentes enzimas que participan en la degradación del almidón, entre las que se puede mencionar a la DPE1 (enzima desproporcionadora 1) como secuencia blanco. En el presente trabajo se probó la actividad de cinasa de SnRK1 sobre la enzima desproporcionadora 1, observándose que es un blanco importante de regulación.

2. Introducción.

Estrés y energía.

Todos los organismos vivos se enfrentan a múltiples tipos de estrés, particularmente las plantas al ser organismos sésiles se enfrentan constantemente a cambios ambientales que ocasionan una fluctuación en los niveles de energía por lo que deben desarrollar mecanismos que les permitan la percepción rápida de perturbaciones en el ambiente para reestablecer la homeostasis, mediante la reprogramación del metabolismo y la expresión de genes. Estas fluctuaciones energéticas se deben a diversos tipos de estrés incluyendo alteraciones causadas por el fotoperiodo, ensombrecimiento, extensión en las horas de la noche, déficit en el flujo de carbono debido al secuestro del mismo por patógenos o por diversas condiciones desfavorables como sequía, temperaturas extremas o inundaciones interfiriendo con la respiración y/o asimilación de carbono (Baena-González *et al.*, 2010, Smith A y Stitt M, 2007).

Se han estudiado algunos de las respuestas de las plantas frente a estas condiciones desfavorables que incluyen el cese del crecimiento, activación del catabolismo para obtener energía de otras fuentes y un decremento en la activación de enzimas biosintéticas. Se ha observado, en el caso del ciclo natural día-noche, que la planta es capaz de percibir

y responder a pequeños decrementos en el estatus de carbono ajustando su crecimiento, almacenamiento y movilización de reservas como se observa en la degradación progresiva del almidón a lo largo de la noche, mismo que fue sintetizado durante el día (Baena-González *et al.*, 2010; Frago *et al.*, 2009)

En los últimos años se han identificado dos proteínas cinasas en *Arabidopsis thaliana*, AKIN 10 y AKIN 11, las cuales forman parte del heterotrímero SnRK1 (Sucrose non-fermenting Related Kinase 1), quien es miembro de una familia de cinasas altamente conservadas en todos los eucariontes identificada como SNF1/AMPK/SnRK1.

Familia SNF1/AMPK/ SnRK1.

La familia SNF1/AMPK/SnRK1, que funcionan como sensores metabólicos ante condiciones de estrés, cumple con diversas funciones dependiendo del organismo. En levaduras, la SNF1 (Sucrose non-fermenting one) tiene un papel fundamental para el cambio del metabolismo fermentativo a oxidativo ante la ausencia de glucosa, controlando la expresión de genes involucrados en el metabolismo de fuentes alternas de carbono, respiración, gluconeogénesis, transporte de nutrientes y meiosis (Sanz *et al.*, 2016). En mamíferos, la AMPK responde ante un aumento en la concentración de AMP y ADP con

respecto a la de ATP causado por ayuno, ejercicio o algún otro tipo de estrés, desencadenando diversos mecanismos para mantener la homeostasis energética, incluyendo señalización celular, crecimiento, proliferación, inmunidad, transcripción y apoptosis (Crozet *et al.*, 2014; Hardie *et al.*, 2007). En el caso de plantas, la SnRK1 (Sucrose non-fermenting 1 related kinase, Cinasa Relacionada a SNF1) también se encuentra involucrado en la respuesta a diferentes tipos de estrés relacionado con múltiples mecanismos como la modulación de la actividad enzimática, vía fosforilación directa de enzimas o regulación de la expresión génica. (Halford y Hey, 2009),

Los complejos de esta familia comparten una estructura heterotrimérica α, β, γ , la cual está altamente conservada a lo largo de la evolución. La subunidad catalítica α se compone por dos partes, el dominio de cinasa y el dominio regulatorio, en el primero se encuentra el loop de activación (T-loop), el cual puede ser activado por la fosforilación de cinasas río arriba en una treonina altamente conservada. Y el dominio regulatorio esta conformado por el dominio de asociación a proteínas ubiquitinadas (UBA) y al dominio de asociación a cinasa (KA1), el dominio α se une a β y γ mediante este dominio. En el caso de SnRK1, se han identificado dos cinasas río arriba que son capaces de fosforilarla denominadas GRIK1 y GRIK2 (Germinivirus replication interacting kinase 1 y 2) que modifican la treonina 175 (Thr-175) de la subunidad

catalítica AKIN10 y a la 176 de AKIN11 (Harthill *et al.*, 2006, Shen *et al.*, 2009).

Además de la subunidad catalítica, los heterotrimeros están conformados por otras dos subunidades regulatorias β y γ . La subunidad β actúa como un andamiaje entre las otras dos subunidades, además de que contienen un dominio de unión a carbohidratos (CBM) que en AMPk y en SNF1 unen glucógeno *in vitro*, en el caso de plantas son dominios de unión a almidón (SBM), este dominio se empalma parcialmente con la secuencia KIS mediante la cual la subunidad β interactúa con la cinasa mientras que el dominio ASC (asociación con SNF1) ayuda a la interacción con la subunidad γ y con SBD. (Crozet *et al.*, 2014). La subunidad gamma, contiene motivos denominados CBS que forman sitios de unión para nucleótidos de adenina, aunque no se ha establecido cuál es la función de éstos en la actividad del complejo de plantas. Cada par de dominios CBS forman un dominio Bateman.

En plantas existen dos subunidades atípicas, la subunidad β_3 que carece del dominio de unión a carbohidratos y la subunidad $\beta\gamma$, una subunidad tipo γ que cuenta con un dominio de unión a almidón (SBM) en el amino terminal (Figura 1).

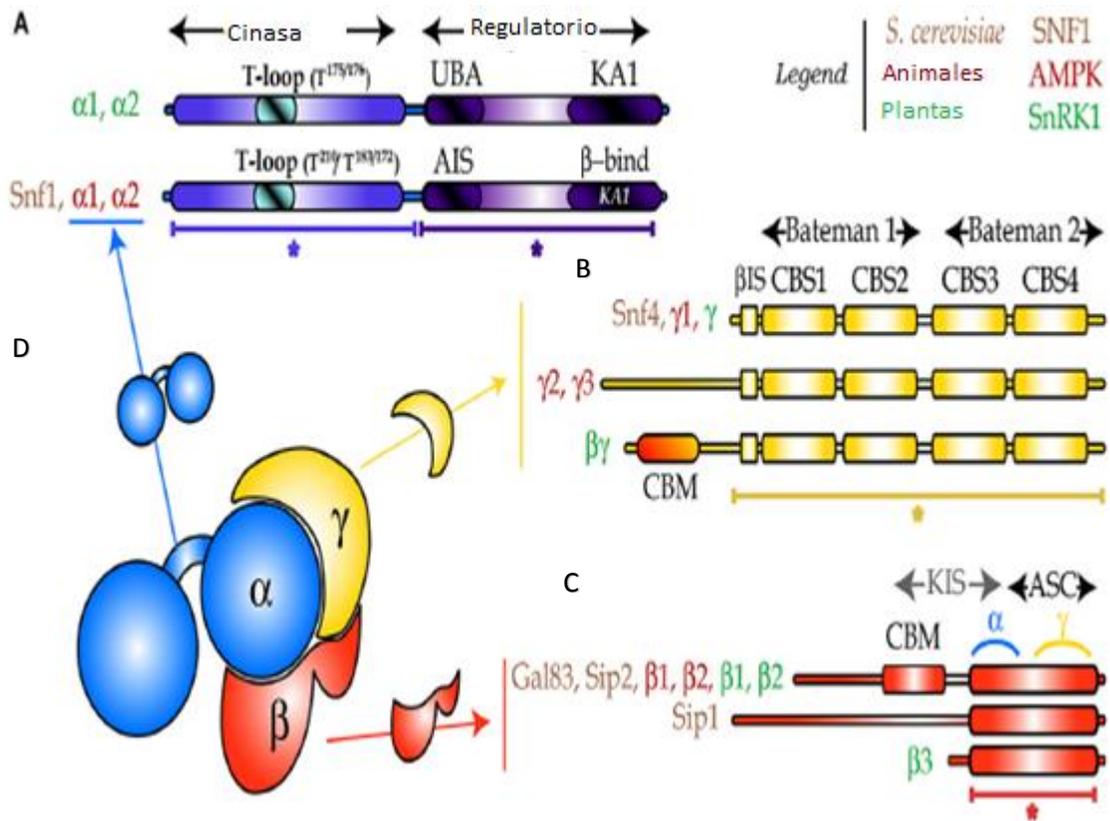


Figura1. Estructura del complejo heterotrimérico de la familia SNF1/AMPk/SnRK1. Se muestran las características de cada uno de ellas y se destacan las diferencias sobre todo en el caso de SnRK1, incluyendo las subunidades atípicas de esta. Modificado de Crozet, 2014.

- A) Estructura de dominios de las subunidades α
- B) Estructura de dominios de las subunidades γ .
- C) Estructura de dominios de las subunidades β .
- D) Composición del trímero activo.

Se ha postulado que existen 6 posibles trímeros activos, cada una de ellas contiene alguna de las dos subunidades α , una de las subunidades β y forzosamente la subunidad $\beta\gamma$. (Shane *et. al*, 2015)

Complejo SnRK1.

Como se ha mencionado anteriormente, la SnRK1 está involucrada en las respuestas a estrés, involucrado en la regulación del metabolismo de carbohidratos por la modulación de la actividad de enzimas.

Se ha observado que SnRK1, específicamente los genes que codifican para la subunidad catalítica α denominados AKIN10 y AKIN11, son capaces de sentir y mandar señales en respuesta a condiciones de estrés como ciclos de obscuridad, ausencia de azúcares y falta de energía disponible, identificando un amplio arreglo de genes y reprogramando su transcripción promoviendo el catabolismo y suprimiendo el anabolismo (Baena-González *et al.*, 2007).

SnRK1 fosforila e inactiva enzimas metabólicas como la HMG-CoA reductasa, involucrada en la síntesis de isoprenoides, la sacarosa fosfato sintasa, involucrada en la síntesis de sacarosa y nitrato reductasa, enzima involucrada en el primer paso de la asimilación de nitrógeno (Sudgen *et al.*, 1999)

SnRK1 dirige al carbono en el proceso del metabolismo del almidón en los órganos de reserva donde la sacarosa sintasa actúa como un sustrato de esta y mediante la activación redox de la ADP-glucosa pirofosforilasa en condiciones metabólicamente favorables inducida por la presencia de trehalosa-6-fosfato (molécula de señalización que refleja la disponibilidad de la sacarosa en la planta) . (Tiessen *et al.*, 2003,

McKibbin *et al.*, 2006, Hey *et al.*, 2010). Paradójicamente, también es requerida para la expresión de α -amilasa, involucrado en la degradación del almidón (Laurie *et al.*, 2003, Hey *et al.*, 2010).

SnRK1 y el metabolismo de carbohidratos.

SnRK1 también está involucrada directamente en la regulación del metabolismo de carbohidratos (Halford *et al.*, 2003, Polge *et al.*, 2007). Se ha observado que SnRK1 es indispensable para la movilización de almidón y para la sobrevivencia de la planta en el período nocturno.

SnRK1 está involucrada con el metabolismo de carbohidratos, la trehalosa 6-fosfato sintasa es fosforilada por la SnRK1 relacionándola directamente con el contenido de trehalosa-6-fosfato. Como se mencionó en la sección anterior en condiciones metabólicamente favorables la trehalosa-6-fosfato inhibe la actividad de SnRK1- (Schluepmann *et al.*, 2004, Harthill *et al.*, 2006, Halford y Hey, 2009). Por otra parte se observó que alimentando con trehalosa a hojas de *Arabidopsis thaliana* se estimuló la producción de almidón en 30 minutos acompañada por la activación de la AGPasa, la primera enzima involucrada en la biosíntesis del almidón, dependiendo de la expresión del complejo SnRK1 (Shane *et al.*, 2015).

También se ha reportado que en líneas transgénicas de papa las cuales sobreexpresan a SnRK1 se incrementan los niveles de almidón y los niveles de glucosas son más bajos al compararlos con plantas wild-type, lo que puede indicar que el proceso de degradación del almidón se ve afectado de alguna manera. (McKibbin *et al.*, 2006)

Se demostró en 1998 que SnRK1 es requerido para expresión del gen de la sacarosa sintasa (Purcell *et al.*, 1998, Halford y Hey, 2009) McKibbin *et al.* en 2006 demostraron que la sobreexpresión de SnRK1 en papa incrementa la expresión de sacarosa sintasa y de la ADP-glucosa pirofosforilasa, causando un incremento en el contenido de almidón y un decremento en la concentración de azúcares libres. (McKibbin *et al.*, 2006, Halford y Hey, 2009).

Por otro lado Kanegae *et al* (2005) dió evidencia que SnRK1 tiene un papel importante en la acumulación de almidón en arroz, mientras que Jain *et al.* demostró que la expresión de un gen de SnRK1 (*SnRK1b*) coincide con la acumulación de almidón en el endospermo y las microesporas de sorgo, esta acumulación de almidón se puede deber a que SnRK1 tiene algún efecto sobre la degradación del almidón.

Por otro lado se ha observado en mohos (*Physcomitrella patens*) deficiente de SnRK1 que no crece sin iluminación continua y que acumula almidón mientras que en un mutante knockdown de SnRK1 en

Arabidopsis durante el periodo oscuro no se moviliza el almidón en hojas, demostrando el papel de SnRK1 en la movilización del almidón durante el periodo oscuro, aunado a esto SnRK1 está involucrado en la relocalización de carbono desde la fuente hasta su almacenamiento en el tejido blanco en respuesta a la herbivoría (Shane *et al.*, 2015).

También en *Arabidopsis thaliana* se ha observado que la degradación de almidón se altera en plantas, doble mutantes *akin10/akin11* acumulando almidón. En particular, se ha observado que esa alteración ocurre cuando existe un estrés energético (Baena-González *et al.*, 2007; Fragoso *et al.*, 2009).

Un tipo de estrés energético común en plantas es la deficiencia de fósforo. SnRK1 está involucrado en esta respuesta reportándose que AKIN 10 aumenta su actividad mientras que AKIN11 se degrada. En una mutante *akin10* en deficiencia de fósforo, donde no existiría AKIN11, se observa que el metabolismo del almidón en particular la degradación se ve afectada (Fragoso *et al.*, 2009). Estos antecedentes sugieren que existe una relación entre el metabolismo del almidón, específicamente la degradación y el complejo SnRK1.

Almidón: carbohidrato de reserva en plantas.

El almidón es el principal y más abundante polisacárido de almacenamiento producido en plantas, depositado en forma de gránulos

insolubles en los cloroplastos. Está conformado por dos tipos de polisacáridos, la amilosa y amilopectina. El primero es un polímero lineal de glucosa que se encuentra unido por enlaces $\alpha(1-4)$, mientras que la amilopectina es un polímero ramificado de glucosas, unidas principalmente por enlaces $\alpha(1-4)$ y que tienen ramificaciones cada 24 ó 30 glucosas mediante enlaces $\alpha(1-6)$.

Degradación de almidón.

La degradación del almidón comienza cuando algunos residuos glucosídicos de la amilopectina son fosforilados reversiblemente por acción de las enzimas glucan water dikinase (GWD) y phosphoglucan water dikinase (PWD) cuya acción relaja y abre las cadenas del almidón favoreciendo la acción de enzimas hidrolíticas como la β -amilasa (BAM3) responsable de metabolizar el almidón en maltosa y en maltoligosacáridos también participan enzimas desramificadoras, como la isoamilasa 3 (ISA3), la α -amilasa y la dextrinasa límite, también conocida como pululunasa (Fettke y Fernie, 2015). (Fig. 2)

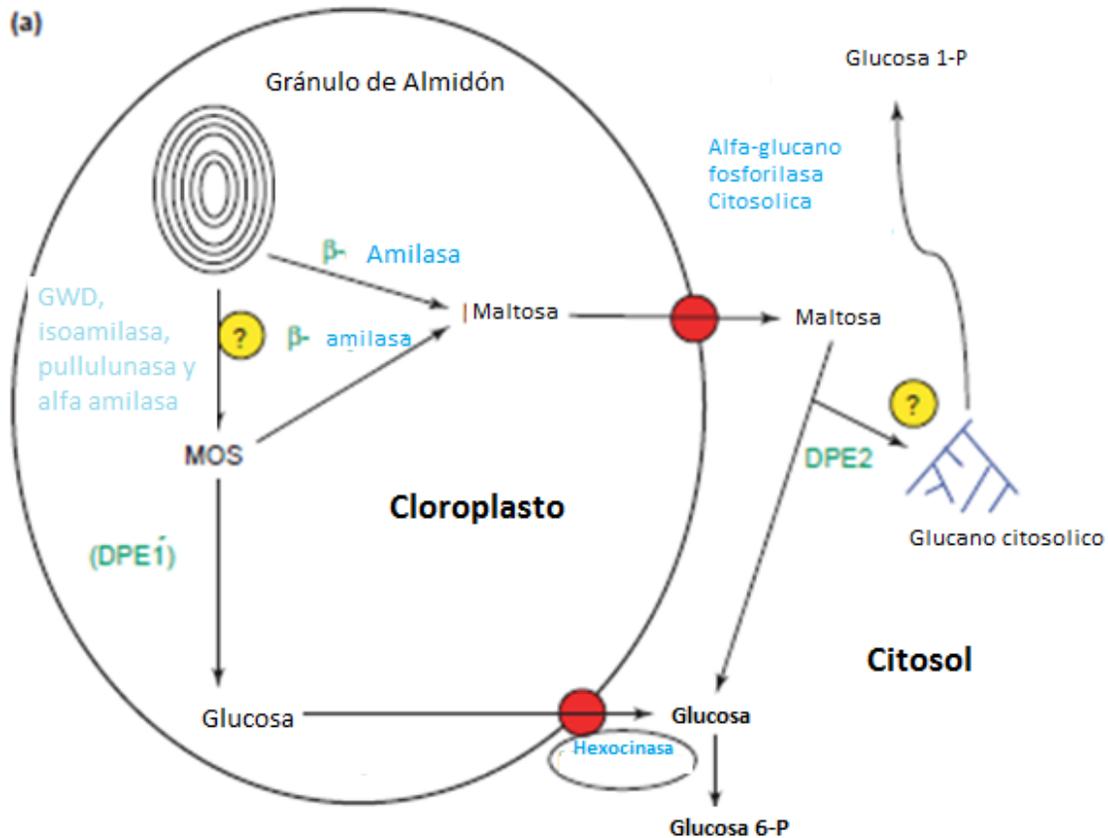


Fig 2. Degradación de gránulo de almidón. Modificado de Lloyd J. *et al* ., 2005.

Enzima desproporcionadora (DPE1).

La enzima desproporcionadora del almidón 1 es una α -(1-4) glucotransferasa localizado en el cloroplasto, se ha caracterizado esta enzima bioquímicamente en chícharo donde se encontró que su $pH_{opt}=7.5-8.0$, su actividad máxima es con maltotriosa como sustrato con una $K_m= 3.3 \text{ mM}$, es posible que utilizó otros maltooligosacáridos de cadena corta al igual que glucosa. (Kakefuda y Duke, 1989)

La función de DPE1 en hojas de *Arabidopsis* fue estudiada mediante una mutante *dpe1* donde se concluyó que esta involucrada en el metabolismo de maltooligosácaridos durante la degradación del almidón, principalmente de la maltotriosa, la cual es un producto de la α -amilasa y la β -amilasa al inicio del periodo nocturno. (Critchley, 2001)

La enzima β -amilasa es incapaz de actuar sobre cadenas de menos de cuatro glucosas por lo que las maltotriosas deben ser metabolizadas por otra enzima conocida como enzima desproporcionadora 1 (DPE1). La DPE1 transfiere dos de los glucosilos de la maltotriosa a una cadena mayor de glucanos, permitiendo de esta manera que la molécula generada esté disponible para la hidrólisis de la β -amilasa y la glucosa restante pueda exportarse al citosol a través del transportador de glucosa localizado en la membrana interna (Tetlow *et al.*, 2004.)

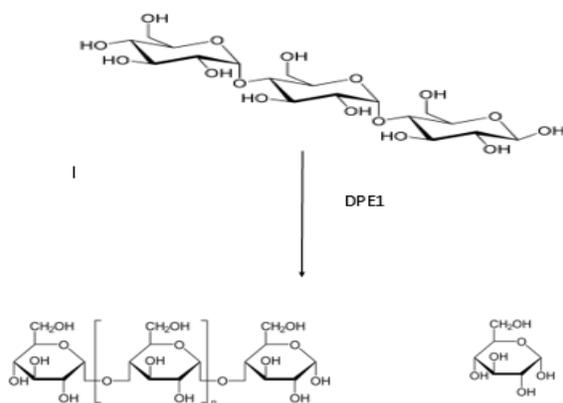


Fig. 3 Esquema de reacción que cataliza DPE1.

DPE1 como posible blanco de SnRK1.

Para determinar si una de estas proteínas cinasas podría ser el complejo SnRK1, se realizó una búsqueda de los sitios consenso de fosforilación que son reconocidos por este tipo de cinasas en la secuencia de la proteína DPE1 utilizando el programa ScanPrositate y se encontraron dos sitios fosforilables por SnRK1. La secuencia consenso de SnRK1 requiere de un aminoácido hidrofóbico en la posición -5 en este caso es leucina, un básico en -3 que es la arginina y en +4 un hidrofóbico que sería leucina en ambos casos. La DPE1 consta de 576 aa y como se observa en la figura 3 los sitios de fosforilación están muy cercanos entre sí, el primero de ellos se encuentra en la posición 4 donde se observa una leucina, para ser fosforilada por SnRK1 sería el sitio -5, en -3 le sigue una arginina y dos aminoácidos después se observa la serina posiblemente fosforilable por SnRK1 en +3 una serina seguida por una leucina, el siguiente sitio está en la posición 19 con una secuencia de aminoácidos muy similar como se observa en la figura 4 esto según el análisis in silico con el programa ScanPROSITE.

-5		-3						3	4	
<u>Met</u>	<u>Xxx</u>	<u>Arg</u>	<u>Xxx</u>	<u>Xxx</u>	Ser	<u>Xxx</u>	<u>Xxx</u>	<u>Xxx</u>	Leu	
Leu		<u>Lys</u>			<u>Thr</u>			Leu	<u>Phe</u>	
Val		<u>Ile</u>						<u>Phe</u>	<u>Ile</u>	
<u>Phe</u>	<u>Arg</u>							<u>Ile</u>	<u>Met</u>	
<u>Ile</u>								<u>Met</u>	Val	
								Val		
<u>Hyd</u>	<u>Xxx</u>	Bas	<u>Xxx</u>	<u>Xxx</u>	Ser	<u>Xxx</u>	<u>Xxx</u>	<u>Xxx</u>	<u>Hyd</u>	Consenso
<u>Hyd</u>	<u>Xxx</u>	Bas	<u>Xxx</u>	<u>Xxx</u>	Ser	<u>Xxx</u>	<u>Xxx</u>	<u>Hyd</u>	<u>Xxx</u>	
Leu	Leu	<u>Arg</u>	<u>Phe</u>	Ser	Ser	Ser	<u>Phe</u>	Ser	Leu	DPE1(S4)
Leu	<u>Phe</u>	<u>Arg</u>	Leu	Ser	Ser	<u>Phe</u>	<u>Asp</u>	Ser	Leu	DPE1(S19)

FIG 4. Comparación de la secuencia consenso donde SnRK1 fosforila con los sitios donde podría actuar en la enzima desproporcionadora DPE1.

3. Antecedentes inmediatos.

En *Arabidopsis thaliana* las subunidades regulatorias que AKIN β γ y AKIN β 2 cuentan con un dominio de unión a almidón, que son motivos de aproximadamente 100 aminoácidos que están asociados, directa o indirectamente con el metabolismo del almidón. Se observa en la figura 4 la unión del almidón a la subunidad AKIN β γ y AKIN β 2. Se ha reportado anteriormente que estas dos subunidades además de unirse con el almidón son capaces de asociarse también con las subunidades catalíticas AKIN10 y AKIN11 (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

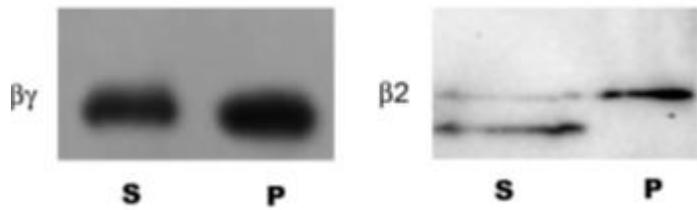


Figura 4. Muestras de las proteínas incubadas con almidón. Los complejos carbohidrato-proteína fueron colectados por centrifugación y la fracción soluble (S) y la unida (P) fueron separadas por SDS-PAGE y se realizó Western Blot usando anticuerpos específicos para las proteínas. Modificado de Ávila Castañeda *et al.*, 2014.

Se ha comprobado que la unión a almidón de las subunidades AKIN $\beta\gamma$ y AKIN $\beta 2$ ocurre en el dominio SBD, la delección de esta secuencia hace que se pierda completamente la unión con el almidón. (Fig 5). El almidón al unirse al complejo provoca un importante decremento en la actividad de cinasa de éste. (Ávila Castañeda, 2014)

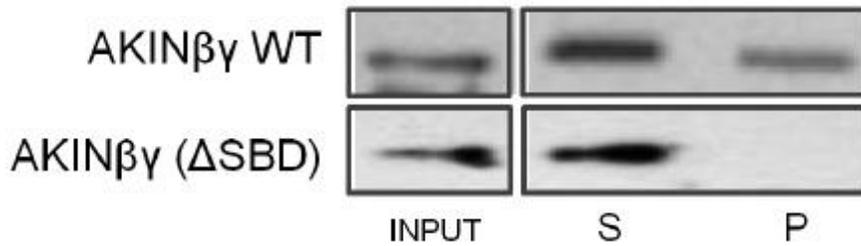


Figura 5. La proteína AKINβγ(WT) es capaz de unirse al almidón a través del dominio SBD como se observa en la fracción unida (P), la proteína que carece del dominio SBD (ΔSBD) no es capaz de unir almidón. Modificado Gallegos Pacheco, 2015.

Aunado a esto se ha localizado a AKINβγ dentro del cloroplasto, donde encontramos a los gránulos de almidón reforzando la hipótesis del papel de esta en el metabolismo del almidón. (Fig. 5) (Ávila Castañeda, 2014)

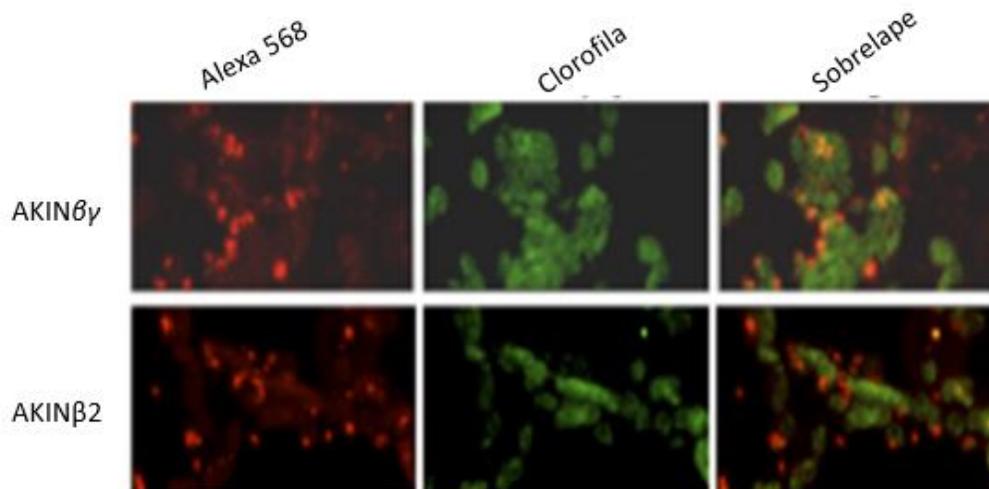


Fig 6. Cortes finos de hoja incubados con anticuerpos específicos contra AKINβγ y AKINβ2, utilizando el fluorocromo Alexa568 (señal roja), clorofila (señal verde) y las

imágenes superpuestas donde se identifica que AKIN β se encuentra en los cloroplastos (señales en color amarillo). Modificado de Ávila Castañeda et al., 2014.

Estos antecedentes sugieren que existe una relación entre el metabolismo del almidón, específicamente su degradación y el complejo SnRK1. Por lo que a partir de esto se ha postulado la siguiente hipótesis.

4. Hipótesis.

La enzima DPE1 involucrada en la degradación del almidón, es blanco de fosforilación del complejo SnRK1.

5. Objetivo general.

Determinar si la enzima DPE1 es blanco de fosforilación por parte del complejo SnRK1 *in vitro*.

6. Objetivos particulares:

- Clonar la secuencia codificante para la enzima desproporcionadora 1 (DPE1) en el vector de expresión pET28b.
- Determinar las condiciones óptimas para sobreexpresar en *E. coli* y purificar a la enzima desproporcionadora (DPE1).

- Realizar ensayos de fosforilación de la enzima DPE1 por parte del complejo SnRK1.

7. Metodología.

Ensayo de restricción de pGEM T Easy DPE1 y pET28b.

Se comenzó con la parte experimental a partir del vector de clonación ya ligado al fragmento DPE1 obtenido de un PCR realizado con anterioridad. Se realizó un ensayo de restricción con las enzimas *XhoI* (INVITROGEN) y *EcoRI* (INVITROGEN), las cuales fueron elegidas debido a que los primers diseñados para el PCR tenían estos sitios de restricción. Primero se realizó el ensayo de restricción utilizando *XhoI* en

un volumen de reacción total de 20 μ L, utilizando 2 μ L de buffer 3.1 10x (INVITROGEN) (100 mM NaCl , 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂ , 100 μ g/ml BSA), 1 μ g de DNA tanto de DPE1 como de pET28b, 0.3 μ L de la enzima XhoI (INVITROGEN 10U/ μ L) y agua para PCR hasta completar el volumen final. Esta reacción se incubó por 1 hora a 37 ° C, después se tomó una alícuota de esta reacción (3 μ L) y se añadió la enzima *EcoRI* al resto de la reacción y se incubó nuevamente a 37°C por una hora. Por otra parte, el vector de expresión pET28b también se digirió con las mismas enzimas y las mismas condiciones para poder realizar la ligación del vector con el fragmento de interés, pET28b se desfosforiló al añadir la enzima CIAP (fosfatasa alcalina) junto con *EcoR1*, con el fin de reducir la autoligación.

Electroforesis en gel de agarosa.

Con el fin de separar los ácidos nucleicos se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) preparado en solución amortiguadora TAE (40 mM de Tris-HCl, 20 mM de ácido acético, 1 mM de ácido etilediaminotetraacético (EDTA) y se le agregó por cada 30 mL de gel de agarosa, 2 μ L de bromuro de etidio (10 mg/mL). Las muestras fueron preparadas agregando buffer de carga 6x (25% (m/v) ficoll 400, 0.25% (m/v) de azul de bromofenol y 0.25% (m/v) de xilen cianol). La

electroforesis se realizó en presencia de solución amortiguadora TAE a 100 V aproximadamente 40 minutos.

Purificación del cDNA correspondiente a DPE1 y del vector de expresión pET28b del gel de agarosa.

A partir del gel de agarosa 1% se utilizó el kit comercial GenElute™ Gel Extraction Kit (SIGMA-ALDRICH), siguiendo las indicaciones del manual dado por el fabricante con el fin de purificar al vector de expresión y al cDNA correspondiente a DPE1.

Ligación del cDNA de DPE1 al vector de expresión pET28b.

Se realizó una mezcla de reacción en un volumen final de 20 μ L, añadiendo 3 veces más inserto DPE1 (1 μ g) que vector de expresión. Se utilizó 1U de la ligasa T4 (Promega) incubándose toda la noche a 4°C. Se realizó un control solo con el vector de expresión para descartar las autoligaciones.

Transformación en células de *E.coli* DH5- α por choque térmico.

Se incubó 50 μ L de células competentes de *E. coli* DH5- α en hielo por 10 minutos y se les agregó 10 μ L de la reacción tanto de ligación como de auto ligación y se incubaron en hielo por 30 minutos. Las mezclas se sometieron a choque térmico por 30 segundos a 42°C e inmediatamente se incubaron en hielo por dos minutos. Se añadió 400 μ L de medio LB y se dejó en agitación constante por 2 horas a 37°C. Pasando este tiempo se sembró en cajas con marcador de selección (kanamicina 50 μ g/mL).

Purificación del plásmido.

Se inoculó una de las colonias de *E. coli* DH5- α en 5 mL de medio líquido LB con kanamicina (50 μ g/mL) durante toda la noche. Se utilizó el kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich), siguiendo las instrucciones del manual del fabricante.

Ensayo de restricción para confirmar la ligación de pET28b-DPE1.

Se realizó un ensayo de restricción con las enzimas *XhoI* y *EcoRI* en un volumen de reacción total de 20 μ L, utilizando 2 μ L de buffer H 10x (PROMEGA) (90 mM Tris-HCL, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl), 1 μ g de DNA, 0.3 μ L de la enzima *XhoI* (PROMEGA, 10U/ μ L) y agua para PCR hasta completar el volumen final. Esta reacción se incubó por toda la noche y

se añadió la enzima *EcoRI* y se incubó nuevamente a 37°C por dos horas más. Al terminar el tiempo de incubación se hizo una electroforesis en gel de agarosa.

Se mando a secuenciar este plásmido (Resultados)

Transformación en *E. coli* BL21-RIL por choque térmico.

Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, pero utilizando células competentes de *E. coli* BL21-RIL con 2 µL de la construcción pET28b-DPE1 en lugar de la ligación.

Determinación de las condiciones óptimas de sobreexpresión de la proteína recombinante DPE1.

Se probaron diferentes condiciones de temperatura y diferentes concentraciones del inductor isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se tomó a las colonias transformadas de *E. coli* BL21-RIL transformados con el plásmido pET28b- DPE1 y se inocularon 5 mL de medio LB con kanamicina (50 µg/mL). Se incubó el medio toda la noche a 37° C bajo agitación (250 rpm). Con la suspensión celular obtenida se inocularon 50 mL de medio LB con kanamicina (50 µg/mL), adicionando un volumen de precultivo (500 µL) y se dejó crecer nuevamente a las células hasta alcanzar un valor de DO600 entre 0.6 y 0.8. Una vez alcanzada esa densidad óptica, se adicionó una solución de IPTG 1 M, utilizándose un volumen de solución necesario para obtener

concentraciones del inductor en el cultivo de 0.1 mM ó 0.5 mM. Los cultivos inducidos se incubaron bajo agitación (250 rpm) a la temperatura de incubación correspondiente. El tiempo de incubación de la inducción a una temperatura de 25°C fue de 4 horas y a 18°C toda la noche. Una vez terminado el tiempo de incubación, se centrifugó la suspensión celular a 4000xg por 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante, la pastilla bacteriana se guardó a -80°C hasta el momento de su uso. La pastilla se resuspendió en el buffer LEW (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl). A la suspensión se le agregó el volumen necesario para tener una concentración final de PMSF y benzamidina de 1mM y lisozima (1mg/ml). Se añadió DNAsa (2µL) y RNAsa (5µL), la solución se incubó en hielo por 30 minutos, y posteriormente se sonicó a una amplitud de 21%, empleando 4 pulsos de 10 segundos con intervalos de descanso entre cada pulso de 10 segundos. El lisado se centrifugó a 10 000 xg por 30 minutos y se separó la fracción soluble de la insoluble.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE.

Para la separación de proteínas se siguió el procedimiento descrito por Laemmli (1970). A las proteínas se le añadió buffer de carga 4x (125mM Tris-HCl pH 6.0, 20% (v/v) de dodecil sulfato de sodio (SDS), 0.4% (m/v) de azul de bromofenol, en una relación 1:4. Las muestras se

calentaron a 90°C por 5 minutos y las proteínas desnaturalizadas se colocaron en un gel de poliacrilamida, que consistía de un gel apilador 3% (m/v) de acrilamida y un gel separador 12% (m/v) de acrilamida. La electroforesis se realizó con buffer de corrida (25mM de Tris-HCl pH 8.3, 192 mM de glicina y 0.1%(m/v) de SDS) a 120 V. Después de la electroforesis se procedió a teñir el gel con una disolución de Azul de Coomassie (0.25% (m/v), ácido acético 10% (v/v) y metanol 50%(v/v)) por toda la noche y en agitación. La solución se destiñó con agua destilada.

Detección de proteínas por Western-Blot.

Las proteínas separadas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, se transfirieron durante una hora a 100 V a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Al terminar la transferencia se bloqueó a la membrana con una solución al 5% de leche descremada en PBS-0.1%tween (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ pH 7, 2.7 mM KCl, 2mM KH₂PO₄, 0.1% Tween 20) durante una hora. Después se dejó con el anticuerpo primario anti histidina (1:10 000) durante toda la noche a 4°C en agitación constante. La membrana al pasar este tiempo de incubación se lavó 3 veces con 20 mL de la solución PBStween por 10 minutos con agitación constante y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (1:50 000) durante una hora. Después de lavar el anticuerpo secundario durante 15 minutos utilizando PBST, el anticuerpo

se reveló utilizando un kit de quimioluminiscencia de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante (Millipore).

Purificación de la proteína recombinante DPE1 a partir de cuerpos de inclusión.

La proteína recombinante se lavó dos veces en el buffer desnaturizante (8M urea, 20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl) durante 30 minutos, después de centrifugar a 10,000 Xg por 15 minutos, se colectó el sobrenadante, se dializó por un día y la proteína recombinante se purificó a través de una columna de afinidad (ProBond) a colas de histidina siguiendo el manual dado por el fabricante. Se cargo toda la muestra obtenida, se utilizó el buffer desnaturizante de lavado (8 M de urea, 20 mM de fosfato de sodio pH 7.8, 500 mM NaCl) dado por el fabricante al igual que el buffer de elución (8 M de urea, 20 mM de bifosfato de sodio pH 4.0, 500 mM NaCl).

Cuantificación de la proteína por método de Bradford.

Para la determinación de proteína total se empleó el método descrito por Bradford (1976). Se cuantificó la proteína utilizando el reactivo de Bradford, de acuerdo a las especificaciones de la casa comercial (BIO-RAD). Se hizo una curva patrón utilizando una solución de albúmina sérica bovina BSA (0.5mg/mL) (Tabla 1). Se determinó el valor de absorbancia $\lambda=595$ nm en un espectrofotómetro Ultrospec 2000. Para las muestras se realizó un procedimiento similar, tomándose volúmenes

de la proteína recombinante obtenida que dieran valores de absorbancia dentro de la curva de calibración.

Tabla 1. Curva patrón para la cuantificación de proteína.

	μg de BSA	μL de BSA	μL de Bradford	μL H ₂ O
1	0	0	30	120
2	1	2	30	118
3	2	4	30	116
4	3	6	30	114
5	4	8	30	112
6	5	10	30	110

Ensayos de fosforilación.

Marca Radioactiva.

Una fracción proteica obtenida anteriormente por el laboratorio que contenía la subunidad catalítica de la SnRK1 se utilizó para fosforilar a la proteína recombinante DPE1. Un μg de DPE1 y 1 μg de las cinasas AKIN10/AKIN11 activadas por su cinasa río arriba GRIK1, se incubaron en una mezcla de reacción que contenía HEPES 40 mM, MgCl₂ 5mM, ATP 30 mM, inhibidores de fosfatasas 0.5 mM, inhibidores de proteasas 1X y 2 μCi de γ-³²P[ATP] por 1 h a 30 °C. La reacción se detuvo al agregar

buffer de carga y la mezcla se calentó por 5 min a 80 °C . Las proteínas se separaron en un gel desnaturizante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. La marca radiactiva se identificó por la exposición de una película KODAK.

Phos-Tag.

Para confirmar los resultados obtenidos en el ensayo de fosforilación descrito anteriormente, se utilizó a la molécula Phos-Tag TM la cual se une a las proteínas fosforiladas reduciendo su migración al someterlas a electroforesis en gel de poliacrilamida. Se utilizó una fracción proteica con la subunidad catalítica SnRK1 para fosforilar a la proteína recombinante DPE1. Un μg de DPE1 y un μg del complejo SnRK1 activado, se utilizaron 3 complejos de SnRK1 A10/ $\beta\gamma/\beta3$, A10/ $\beta\gamma/\beta1$, A10/ $\beta\gamma/\beta2$ y A11, previamente activados por GRIK, se incubaron en una mezcla de reacción que contenía HEPES 40 mM, MgCl_2 5mM, ATP 30 mM, inhibidores de fosfatasas 0.5 mM, inhibidores de proteasas 1X y 0.1 ATP por 2 horas a 30°C. La reacción se detuvo al congelarse a -20°C hasta su uso. Posteriormente las proteínas se separaron en un gel desnaturizante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF para realizar un Western-Blot descrito anteriormente.

8. Resultados.

Ensayo de restricción de pGEM-DPE1 y pET28b.

Se realizó un ensayo de restricción con pGEM DPE1 y pET28b con las enzimas *XhoI* y *EcoRI* (Fig 7). Las bandas pertenecen al inserto DPE1 (1711 pb) congruente con lo esperado ya que se observa por debajo de la banda de 2000 pb y pET28b (5400 pb). El vector de expresión se digirió con las mismas enzimas con el fin de dejar extremos cohesivos que faciliten la ligación con la DPE1. Como se mencionó en la metodología, se añadió al vector la enzima CIAP (fosfatas alcalina intestinal), con el fin de tener el vector desfosforilado evitando que se recircularice.

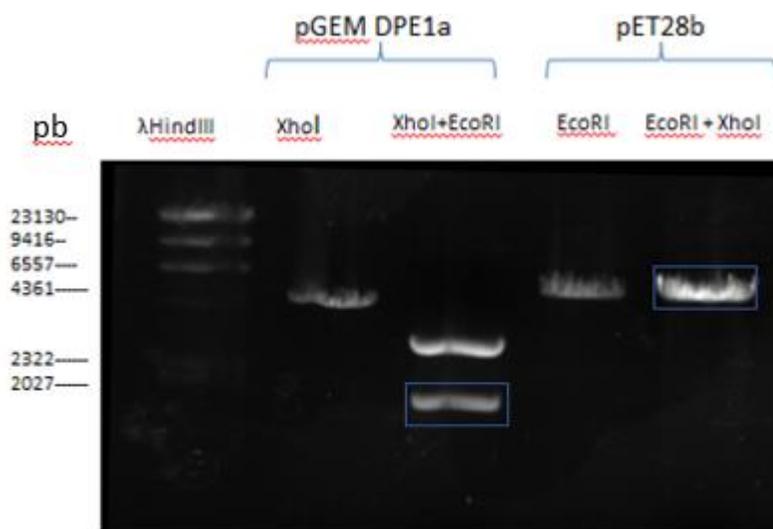


Fig. 7 Ensayo de restricción de PGEMDPE1 y pET28b con las enzimas EcoR1 y Xho1. Las bandas en rectángulos pertenecen al cDNA correspondiente a DPE1 y al vector de expresión pET28b con los extremos cohesivos en gel de agarosa.

Ligación de pET28b-DPE1.

A partir de la purificación del gel de agarosa, se realizó la ligación entre el vector de expresión pET28b y el cDNA correspondiente a DPE1. Se obtuvieron 11 colonias de la ligación entre el vector y el inserto y no se observó ninguna en el control (autoligación) donde sólo se agregó a pET28b.

Para verificar que las colonias obtenidas correspondieran a pET28b ligado al cDNA de DPE1, se purificó el plásmido y se realizó el mismo ensayo de restricción con *EcoRI* y *XhoI* de las colonias 8,9 y 10 (Fig. 8).

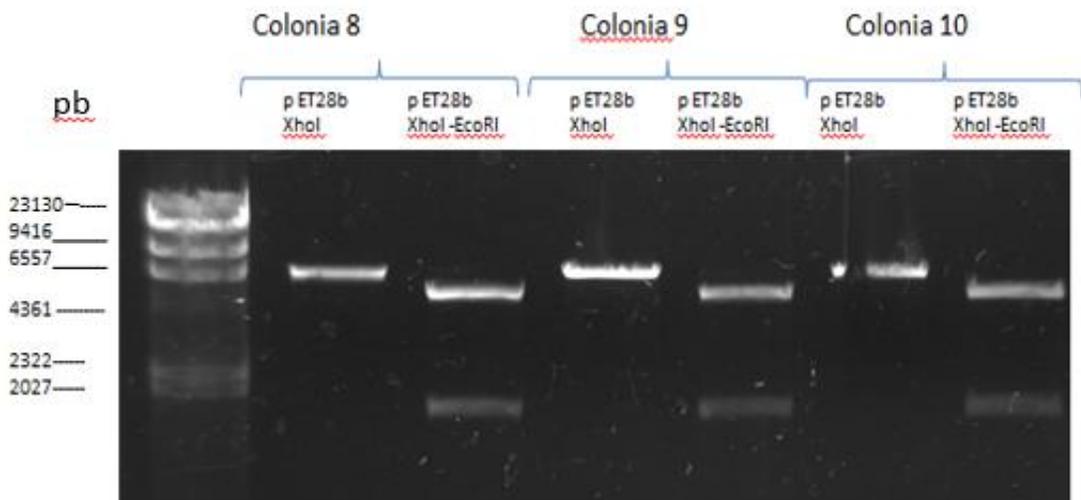


Fig. 8. Electroforesis en gel de agarosa del ensayo de restricción de pET28b-DPE1 con *XhoI* y *EcoRI*.

Se mando a secuenciar el plásmido obtenido:

Thu Oct 19, 2017 11:41 CDT
DPE1_Sequenciado IFC_2.fa from 1 to 1954
Alignment to
DPE1 mRNA.fa from 1 to 2022
Matches (|):1838
Mismatches (#):27
Gaps (-):246
Unattempted (.) :0

```
1 NNNNNNNNNtNcNtctAGNATAATTTGTTAACTTAAAGAAGGagatATACCATGGGCAGCAGCCATCATCatcatcATcacaGCA----G- CCGCC 95
1 -----c-tcaag-a-----g-caac-aa-a-----atat-g-t-c-g-a-c-t-gt-t-t-t-t-tg-attttgtc- atc 44

96 TGGTCCCGCCGGCAGCCATATGGCTAGCATGACTG--GTGGACAGC--AAATGGGTCGGGATCCGA--AT--TCTATGTCGATTCTACTTAGGCCGTC 186
45 tgggt-g-----at-----tag-a-g--tggagtgg--agctttgaaat-----ggat--gatcattatccatgtogattctacttaggcgctc 114

187 GTCCTCTCCTTCACTCTGTCTCTCTCAAGCTTTTCCGATTATCTCTCCGGATTCTTTAATCGACGCAGCTGTCTCAGGAACAGGACAAAGCCGTCG 286
115 gtctctccttcaactctgtctctcctcaagctttccgattatcctctccggattctttaatcgacgcagctgtctcaggaacaggacaagccgtcg 214

287 CAGTCGTTTCAATGGAGGTCGTTTCGAGTAATCCACGTGCTTCTAGTATTAGCGTCGGTGAAGATTTCCATCAGAATATGAGCAGTGGCTACCGG 386
215 cagtcgtttcgaatggaggtcgtttcagtaattccacgtgtcttctagtagtagcgtcggtgaagatttccatcagaatgatgacagtggtaccgg 314

387 TTCGGATCCAGAGAGCAGGAGAGAGCTGGCCTTTTGGCACACCCAGCGTCTTCTGTCCTCATGGCATTGGTGATCTCGGAGAAGAACCTTCCG 486
315 tccggatccagagagcaggagaagagctggcgttttgcacaccgcagctgtttcgtggctcctcatggcatgtgtgatctcggagaagaagcctccg 414

487 GTTCATCGATTGGCTTCACTTCTACTGCTGCCGTTTGGCAGGTTCTTCTCTTGTCTCCAGACGAAGGAGATCTCCTTATGACAGGACAGGATGCA 586
415 gttcatcgattggcttcaactctactggttgcctcgtttggcaggttcttctcttgttctccagacgaagaggatctccttatgaggacaggatgca 514

587 AATGTGGGAACACATTGTGATTCTCTAGATGAGCTTGTGAAAGACGGCTTGTAAATCAAGGATGAGCTCCACACCAATTTGATGCTGACTCTGTGA 686
515 aatgtgggaacacattgtgattctctagatgagcttgtgaaagacggcttgttaatcaaggatgagctcccacaaccaatgtgactctgtga 614

687 ACTATCAGACTGCCCAAGTAAAGAGTCCCTTGATTACGAAGGCAGCAAAAGGCTTATGATGGCAATGGTGAATGAAGAGCAAACCTGCTAGATTT 786
615 actatcagactgcccaagtaaaagagtccttgattacgaaggcagcaaaaggcttattgatggcaatggtagaactgaagagcaaacctgctagatt 714

787 CCGTAAACGACCCCTCTATATCATGTGGCTTGAAGATGCTGCTTATTTCAGCTATTGACAATACTTTAAATGCATACAGTTGGTTTTCAGTGGCCGTA 886
715 ccgtaaacgacccctctatcatgttggcttgaagatgctgcttatttcagctattgacaatactttaaatgcacagttggttgcagtggtgaa 814

887 CCACCTTAAAAACCGTCACTTTCTGCCCTGGAAGCTATATATGAAAGCCAAAAGGAGTTTATAGACTTGTTCATTGCTAAGCAATTTTGTTCCAAAGGC 986
815 ccacttaaaaacgctcatcttctgccttggaaagtataatgaaagccaaaaggagttatagactgttcattgctaaagcaattttgttccaaaggc 914

987 AGTGGCAGAAAGTTCGTGAGTATGCACGGCCGCAAGGAGTGTATATAATGGGAGATATGCCCATTTATGATAGGATATCACAGTGCAGACGTTGGGGCAA 1086
915 agtggcagaaagtctcgtgagatgcacggccgcaaggagtgatataatgggagatagccatttatgtaggataccacagtgcaagcgttggggcaaa 1014

1087 TAAGAAACA-NNN#TACTGAACAAGAAAGGCTTTCCTCTTCTTGTGTAAGCGGTGTTCCTCTGACTTGTTCAGTGAAACTGGTCAACTGTGGGGCAGCCCT 1185
1015 taagaaacatttcttactgaacaagaaaggctttcctcttcttggtagcggtgttccctcctgacttgttcagtgaactggtcaactgtggggcagccct 1114

1186 CTTTATCACTGAAAGCAATCGAGACTGACCAATATTCTTGGTGGCTTAATCGAATAAGACGCCACAGGACTTGTATCAGAAATGCAGGATTGATCACT 1285
1115 ctttactactgaaagcaatcgagactgaccaatattcttgggtggcttaatcgaataagacggcagagacttgtatgacgaatccagattgact 1214

1286 TCAGAGGATTTGCAGGTTTGGGGCGTCCCTTCTGAAGCGAAAGTTCGCATGGTGGACGATGGAAGTAGGACCTGGAAAGTCAATATTGATGCCAT 1385
1215 tcagaggatttgcaggtttggggcgtcccttctgaagcgaagttgcctgggtggacgatggaagtaggacctggaaagtcaattatgttagtccat 1314

1386 TTCCAAAGCGCTTGGGAAGATCAAATCATAGCTGAAGATTTGGGAGTTATTACTAAAGATGTAGTTGAGCTGAGGAAATCTATCGAGCACCTGGAATG 1485
1315 ttccaaagcgttgggaagatcaaatcatagctgaagatttgggagttattactaaagatgtagttgagctgaggaatctatcgagcacctggaatg 1414

1215 tcagaggatttgcagggttttggggcgtcccttctgaagcgaagttgccatggttggacgatggaagtaggacctggaaagtcattatgtatgccc 1314

1386 TTCCAAAGCGCTTGGGAAGATCAAATCATAGCTGAAGATTTGGGAGTTATTACTAAAGATGTAGTTGAGCTGAGGAAATCTATCGAGCACCTGGAATG 1485
1315 ttccaaagcgttgggaagatcaaatcatagctgaagatttgggagttattactaaagatgtagttgagctgaggaatctatcgagcacctggaatg 1414

1486 GCCGTCTCCAATTGCTTTGGAGGAGGCCCGGATAACCCACATTTACCTCACATCATGAAGTAAACCAAGTGTATACTCTGGAACCTCATGACAACG 1585
1415 gccgtctccaattgctttggagagggccggataacccacatTTACCTCACATCATGAAGTAAACCAAGTGTATACTCTGGAACCTCATGACAACG 1514

1586 ACACATTCGAGGCTGTGGGACACTCTGGACCAAGAAGAAAAGTCTAAGGCAATGAAATACCTGTCGATAGCTGGAGAAGCAGATATATCATGGTCAGT 1685
1515 acacatcagggctgtgggacactctggaccaagaagaaaagtctaaggcaatgaaatacctgctgatagctggagaagacgatatacatggctcagt 1614

1686 CATCCAAGCTGCATTCTCTCAACCGCTCAACCGCAATCATAACCGATGCAAGACATTTAGGACTTGGAAAGTCTGCCAGGATGAACACTCCAGCCACT 1785
1615 catccaagctgcattctctcaaccgctcaaccgcaatcataacgatgcaagacatcttagacttggaaagttctgccaggatgaacactccagccact 1714

1786 GAGGTGGGAAATGGGGTTGGAGGATTTCCAAGTTCACAGCTTTGATAATCTTGAACATGAATCTGACAGACTCAGAGATCTTTTgCATTNcAcGGAC 1885
1715 gaggtgggaaatggggttggaggattccaagttcaacagctttgataatcttgaacatgaatctgacagactcagagatcttttgcattncacggac 1814

1886 GCCTT-----C-T-----CG-----AGCA-----C-----C-A-C-----CAC-----C-a-----c-----C-- 1909
1815 ggcttggagaaaacatttgacgtggaaaag-aagaagaatccttggtttcttcttactcttttttggtaactttgtcattggtaaaagcaataaagtaagcag 1913

1910 ---AC---C-A-C-----TGA-----GATCCG--GCT-----GC---TA-A-CA-A---A-C-C---C-C-----AA-a----- 1943
1914 aagacgaacgaagcatgttggtaaatagtgat-cgatg-ttgatagggccatataatgatgatggcatgttcaatctcactgttgccttaataaatttt 2011

1944 NNNNNNNNNNN 1954
2012 gttcattgata 2022
```

Determinación de las condiciones óptimas de sobreexpresión.

El plásmido purificado se utilizó para transformar cepas de *E. coli* BL21-RIL, se utilizó esta cepa ya que contiene genes que codifican para ARNt poco comunes en bacteria y que de no tenerlos la expresión de las proteínas recombinantes se vería limitada. Se probaron 4 condiciones de sobreexpresión a diferentes temperaturas y diferentes concentraciones del inductor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Las condiciones probadas fueron las siguientes:

- Condición 1: 0.1 mM a 18°C por 24 horas.
- Condición 2: 0.5 mM a 18°C por 24 horas.
- Condición 3: 0.1 mM a 25°C por 4 horas.
- Condición 4: 0.5 mM a 25°C por 4 horas.

La proteína recombinante se espera en un peso teórico de 64 kDa. Después de su extracción se observó que la mayor concentración de proteína se obtiene a 25°C; sin embargo, la mayor parte de la proteína recombinante se encuentra en agregados insolubles llamados cuerpos de inclusión, lo que significa que la proteína de interés, DPE1, no fue plegada correctamente. En la figura 9 la banda correspondiente a la proteína recombinante DPE1 se muestra en recuadros amarillos.

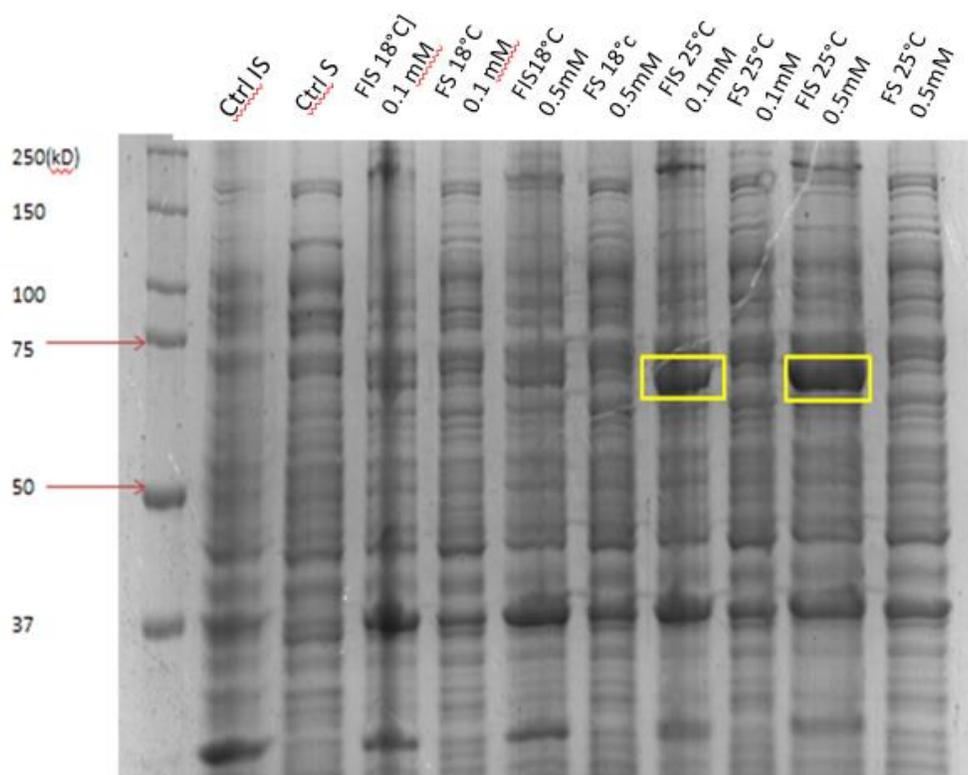


Fig 9. Electroforesis en gel de poliacrilamida 12%. Determinación de las condiciones óptimas de sobreexpresión. En recuadros amarillos se resalta a DPE1 en las condiciones óptimas. Ctrl IS= control insoluble, Ctrl S.= control soluble, FIS= Fracción insoluble, FS= fracción soluble.

Purificación de la proteína recombinante.

Debido a que en la fracción insoluble la proteína se encuentra plegada incorrectamente en los cuerpos de inclusión, se decidió probar si en la fracción soluble a una concentración de 0.5 mM de IPTG y a 25°C se encontraba la proteína recombinante aun en pequeñas cantidades. Para ello, la proteína presente en la fracción soluble e insoluble tanto de las células control (*E. coli* BL21-RIL sin transformar) y las células

transformadas, se separaron en un gel de SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF para revelarlo mediante un Western blot utilizando un anticuerpo que reconoce el tag de histidina presente en la proteína recombinante. La figura 10 muestra un gel teñido con Azul de Coomasie de las fracciones proteicas (Fig. 10 A) y los resultados del Western blot indican que toda la proteína se encuentra en la fracción insoluble de las células transformantes (Fig. 10 B). La banda reconocida en la fracción soluble que puede pertenecer a la proteína aparece de igual manera en control, por lo que se descarta que pertenezca a la proteína de interés.

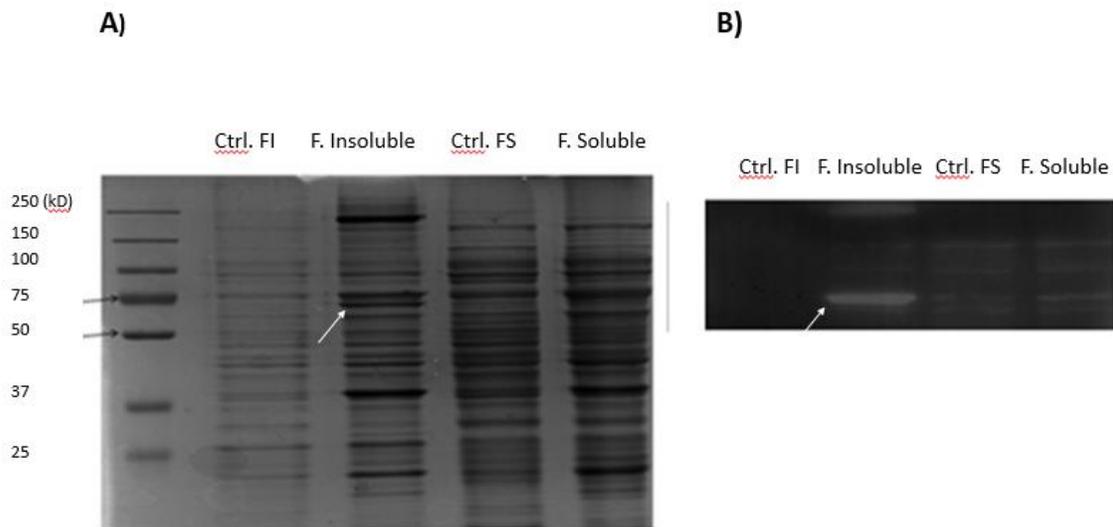


Fig. 10 A) Proteínas separadas por SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomasie. Se señala con una flecha blanca a la banda que corresponde a la proteína de interés. B) Western blot de las fracciones mostradas en A utilizando un anticuerpo contra el tag de

HIS. El control representa las proteínas de *E. coli* sin transformar. Señalado por una flecha blanca la proteína de interés.

Dado que no era posible obtener la proteína en forma soluble, se decidió utilizar a la proteína extraída de los cuerpos de inclusión. Para la realización de la extracción se utilizó un amortiguador en condiciones desnaturalizantes y posteriormente la muestra se dializó para eliminar el exceso de urea. La figura 11 muestra el gel teñido por azul de Coomasie en donde se observa una proteína en la masa molecular esperada para la DPE1 con un alto grado de pureza (Fig. 11 A) y el Western blot (Fig. 11B) indicó que el anticuerpo reconoce específicamente esta proteína.

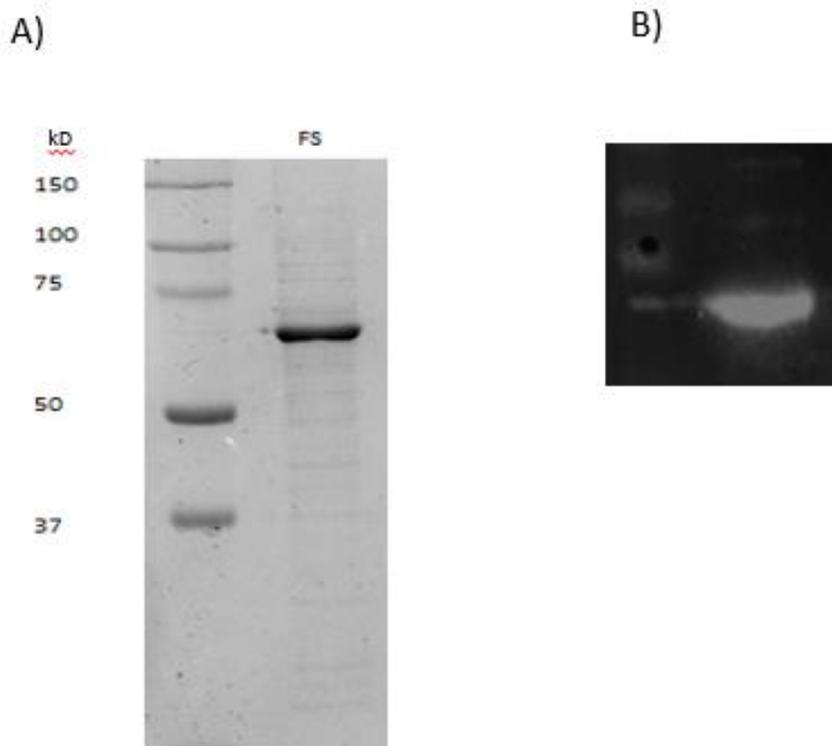


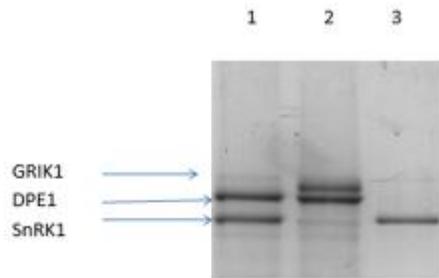
Fig. 11 A) SDS-PAGE de la DPE1 extraída de los cuerpos de inclusión y teñidas con Azul de Coomasie. Se observa claramente la banda correspondiente a la proteína de interés. B) Western blot utilizando anticuerpo contra el tag anti-HIS confirmando que la banda pertenece a la DPE1.

Ensayo de fosforilación.

Con el fin de saber si la proteína DPE1 es sustrato de fosforilación de la cinasa SnRK1, se realizaron los ensayos de fosforilación. En la figura 12 se muestra un gel teñido con Azul de Coomassie en donde se indican en el carril 1 la DPE1 y la cinasa SnRK1; en el carril 2 la DPE1 y la cinasa activadora de SnRK1 (GRIK1) y en el carril 3 el control de autofosforilación de la SnRK1. La autorradiografía de este gel (Fig 12 B)

indica que la DPE1 es fosforilada por la SnRK1 (carril 1), mientras que la GRIK1 solamente muestra autofosforilación (carril 2). La SnRK1 tiene una actividad de autofosforilación muy baja (carril 3).

A) Azul de Coomasie.



B) Autorradiografía

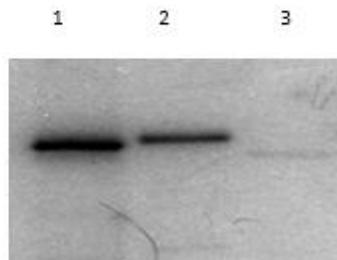


Fig. 12. A) Separación de las proteínas después de la reacción de fosforilación a través de un SDS-PAGE. B) Autorradiografía de la exposición a una película de Rayos X para identificar la incorporación de la marca radioactiva. 1) DPE1 y SnRK1; 2) DPE1 Y GRIK1; 3) Control SnRK1.

Para verificar los resultados obtenido con la marca radioactiva se realizó un ensayo de Phos-Tag en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE el cual es indicativo de las formas fosforiladas de la proteína, ya que la molécula

Phos-tag interacciona con el fosfato de las proteínas, disminuyendo la velocidad de migración y separándolas de las proteínas no fosforiladas. En la figura 12, se observa el Western Blot donde en el carril 1 se encuentra la DPE1 sola, en los siguientes carriles DPE1 se observa fosforilada por distintos complejos de SnRK1, en igual medida. Con excepción de lo observado en el último carril con la subunidad A11 donde disminuye la migración significativamente en comparación con los demás indicando un mayor grado de fosforilación. Los complejos fueron obtenidos previamente en el laboratorio.

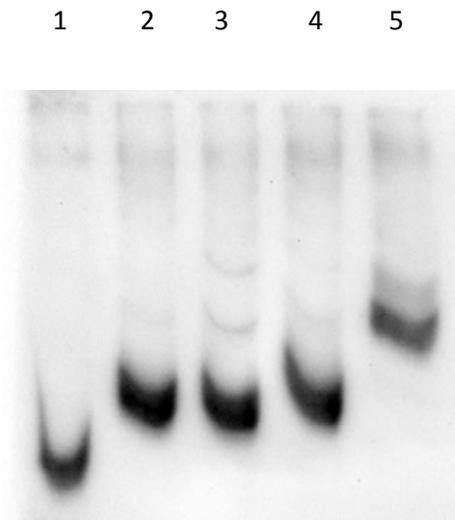


Fig 13. Western Blot de ensayo con Phos-Tag donde se observa la fosforilación de DPE1 por distintos complejos de SnRK1. En el carril 1 se encuentra DPE1 sola, en el carril 2, DPE1+SnRK1 (A10/ $\beta\gamma/\beta3$), en el carril 3 DPE1 +SnRK1 (A10/ $\beta\gamma/\beta2$), en el

carril 4, DPE1 + SnRK1 (A10/ $\beta\gamma/\beta$ 1), y en el carril 5, DPE1 + A11 (subunidad catalítica).

9. Discusión y conclusiones.

El metabolismo del almidón en las plantas es un proceso de gran importancia ya que es el principal carbohidrato de reserva de energía, lo que le permite a la planta sobrevivir a diferentes condiciones donde su suministro de energía se ve disminuido. Por este motivo el conocimiento de los mecanismos de regulación de su metabolismo resulta trascendental y pueden ser utilizadas para aplicaciones biotecnológicas e industriales. Se ha documentado que tanto la síntesis como la degradación del almidón se llevan a cabo por la acción de una serie de enzimas localizadas tanto en el cloroplasto como en el citoplasma celular. La actividad y localización de las enzimas depende de modificaciones post-traduccionales, dentro de las cuáles se encuentra la fosforilación, que es llevada a cabo por proteínas con actividad de cinasa. En plantas destaca la familia de cinasas SnRK1 que tiene una participación muy importante en el proceso de degradación del almidón (Baena-González et al., 2007; Fragoso et al., 2009) y que además es clave para el mantenimiento de la homeostasis y regulación metabólica. La búsqueda *in silico* de la secuencia consenso que reconoce la SnRK1 en enzimas que participan en la degradación del almidón, permitió determinar que la proteína DPE1 contiene dos sitios potenciales de

fosforilación (Figura 3) por parte de la cinasa (Ruiz-Gayosso, datos no publicados).

La clonación del cDNA, así como la sobre-expresión y la purificación de la proteína recombinante DPE1, permitió analizar aspectos interesantes de esta enzima. Durante la optimización de la sobre-expresión, se encontró que algunas de las condiciones que fueron utilizadas favorecían la acumulación de la proteína en cuerpos de inclusión (Figura 9) probablemente como consecuencia del mal plegamiento de la proteína, lo que conduce a una enzima inactiva. Debido a que esta característica puede no ser limitante para evaluar la fosforilación de esta enzima por parte de la SnRK1 porque la cinasa podría reconocer el sitio de fosforilación incluso cuando la estructura secundaria y terciaria no fuera la nativa, se decidió solubilizar a la proteína con urea (Figura 11) y después retirarla mediante diálisis.

Los ensayos de fosforilación con marca radiactiva (^{32}P) realizados con la proteína recombinante renaturalizada de los cuerpos de inclusión indican que esta puede ser fosforilada por el dominio catalítico de la cinasa SnRK1.2 (Figura 12), pero no por la cinasa activadora GRIK1.

A pesar de que estos experimentos sugieren que la cinasa puede fosforilar a la enzima DPE1, en la naturaleza la SnRK1 se encuentra en forma heterotrimérica. Por esta razón, se analizó la fosforilación en un

gel de poliacrilamida Phos-tag utilizando varias combinaciones de las subunidades de SnRK1 (Figura 13) para formar los heterotrímeros recombinantes, los cuales fueron obtenidos en el laboratorio previamente. Este ensayo, sugiere que los complejos formados por AKIN10-AKIN β γ -AKIN β 1/ β 2/ β 3 son capaces de fosforilar a DPE1, aparentemente en igual medida. La fosforilación llevada a cabo únicamente con el dominio catalítico de AKIN 11 sugiere un estado diferente de fosforilación (Figura 13, carril 5) respecto a la que realizan los trímeros, lo cual podría ser indicativo de que las subunidades reguladoras sirven para darle especificidad a la cinasa.

Estos experimentos, permitieron corroborar que la enzima DPE1 es un blanco *in vitro* de SnRK1, aunque permanece la interrogante acerca de la influencia de esta modificación post-traducciona l en la actividad de la DPE1.

En este sentido, la fosforilación de DPE1 por parte de SnRK1 podría tener como consecuencia la activación de la enzima permitiendo que actúe y siga con el proceso de degradación del almidón.

10. Conclusiones

- Se obtuvo la proteína recombinante DPE1 solubilizada de cuerpos de inclusión.
- La proteína DPE1 se fosforila por el complejo con actividad de cinasa SnRK1.

11. Perspectivas.

- Analizar cuáles y cuántos son los sitios de fosforilación modificados por SnRK1 en la proteína DPE1.
- Estudiar la actividad de la enzima DPE1 en un estado fosforilado y no fosforilado.
- Estudiar los estados de fosforilación de la proteína DPE1 *in vivo* y evaluar el efecto sobre la degradación del almidón.

12. Bibliografía

1. Ávila Castañeda, Gutiérrez-Granados Natalia, Ruíz-Gayosso Ana, Sosa Peinado Alejandro, Martínez Barajas Eleazar & Coello Patricia, 2014, Structural & functional basis for starch binding in the SnRK1 subunits AKIN β 2 and AKIN β γ , *Frontiers in plant science*, Vol. 5, Art. 199.
2. Baena González E., Rolland F., Thevelien Johan, Sheen J., 2007, A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling, *Nature*, Vol 448, pp. 938-942.
3. Baena González E., 2010, Energy Signalling in the regulation of gene expression during stress, *Molecular Plant*, Vol.3, Issue 2, 300-313.
4. Bernal L, Coello P, Martínez-Barajas E, 2005, Possible role of R1 protein on starch accumulation in bean seedling (*Phaseolus vulgaris* L.) under phosphate deficiency, *Plant Physiology*, 162, 970-976.
5. Ciereszko I., Barbachowska A, 2000, Sucrose metabolism in leaves and roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L) during phosphate deficiency, *Plant Physiology*, 149, 343-348.
6. 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.
7. Critchley J, Zeeman S., Takeshi T., Smith A., Smith S., 2001, A critical role for disproportionating enzyme in starch breakdown is revealed by a knock-out mutation in *Arabidopsis*, *The Plant Journal*, 26, pp 89-100.
 8. Crozet P, Margalha L, Confraria A, Rodrigues A, Martinho C., Adamo M., Baena-González E. ,2014, Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases, *Frontiers in plant science*, Vol. 5, Art. 190.
 9. Fettke J., & Fernie A., Intracellular and cell-to-apoplast compartmentation of carbohydrate metabolism, *Cell Press*, 490-497.
 10. Fragoso S., Espídola L., Paéz Valencia J, Gamboa A., Martínez-Barajas E., Coello P., 2009, SnRK1 isoforms AKIN10 and AKIN11 are differentially regulated un *Arabidopsis* plants under phosphate starvation, *Plant Physiology*, Vol. 149, pp. 1906-1916.
 11. Gallegos P., 2016, Expresión y caracterización de la subunidad de AKIN β de la SnRK1 de *Arabidopsis thaliana* sin el dominio de union a carbohidratos, Tesis.

12. Halford NG & Hey S, 2009, SNF1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signaling in plants, *Biochemical Journal*, Vol 419, 247-259.
13. Halford NG, Paul MJ, 2003, Carbon metabolite sensing and signaling, *Plant Biotechnology Journal*, Vol 1, Issue 6, pp 381-398.
14. Hardie D., 2007, AMP-activated/SNF1 proteein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 774-785.
15. Harthill JE, Meek SE, Morrice N. , Peggie MW, Borch J, Wong BH, Mackinthosh C, 2006, Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose, *The Plant Journal*, Volume 47, Issue 2, pp 211-223.
16. Hey S, Byrne E, Halford N, 2010, The interface between metabolic and stress signaling, *Annals of botany*, Vol 105, pp. 197-203.
17. Jain M, Li Q-B, Chourey PS, 2008, Cloning and expression analyses of sucrose non-fermenting 1 related kinases 1 (SnRK1b) gene during development of sorghum and maize endosperm and its implicated role in sugar to starch metabolic transition, *Physiol. Plant.*, 134: 161-173
18. Kakefuda G. & Stanley D., 1989, Characterization of Pea Cloroplast D-Enzyme, *Plant physiology*, 91, pp. 136-143.

19. Kanegae H, Miyoshi K, Hirose J, Tyuchimoto S, Mori M, Nagato Y, Takano M, 2005, Expressions of rice sucrose non-fermenting 1 protein kinase 1 genes are diferentially regulated during the caryopsis development, *Plant Physiology Biochem*, 43: 669-679.
20. Laurie S., McKibbin Rs, Halford NG, 2003, Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene repress transient activity of an α -amylase (alpha-Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, pp- 739-747
21. McKibbin R, Muttucumaru N, Paul M, Power S, Burrell M, Coates S, Purcell P, Tiessen A, Geigenberger P, Halford N, 2006, Production of high-starch, low-glucose potatoes throughover expression of the metabolic regulator SnRK1, *Plant Biothechnology Journal*, Vol. 4, Issue 4, pp 409-418.
22. Orzechowski S., 2008, Starch metabolism in leaves, *Acta Bioquímica Polonica*, 55, 435-445.
23. Polge C., Thomas M, 2007, SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of control energy? *Trends Plant Science*, 12, 20-28
24. Purcell PC, Smith AM, Halford NG, 1998, Antisense expression of a sucrose non fermenting one related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase transcripts in leaves, *Plant Journal*, 14: 194-202.

25. Ruiz Gayosso Ana, 2015, Caracterización del dominio de unión a almidón (SBD) presente en la subunidad reguladora AKIN 2 del complejo SnRK1 de *Arabidopsis thaliana*, Tesis Facultad de Química, UNAM.
26. Sanz, P., Viana, R., Garcia-Gimeno, M. A. (2016) AMPK in Yeast: The SNF1 (Sucrose Non-fermenting 1) Protein Kinase Complex., *EXS 107*, 353–374.
27. Shane E, Doblin MS, Stapleton D, Bacic A, Gooley PR, 2015, Molecular insights into the enigmatic metabolic regulator, SnRK1, *Trends in Plant Science*, Vol. 21, Issue 4, pp 341-353.
28. Schlupe H, Pellny T, Van Dijken A, Smekens S, Paul MJ, 2004, Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose 6-phosphate accumulation, *Plant Physiology*, 135:879-890.
29. Shen W, Reyes MI, Hanley Bowdoin, 2009, *Arabidopsis* protein kinases GRIK1 and GRIK2 specifically activate SnRK1 by phosphorylating its activation loop, *Plant Physiology*, vol. 150, No. 2, PP. 996-1005.
30. Smith A. & Stitt M., 2007, Coordination of carbon supply and plant growth, *Plant Cell & Environment*, Vol. 30, Issue 9, pp 1126-1149.

31. Sugden C, Crawford RM, Halford NG, Hardie DG, 1999, Regulation of spinach SNF1- related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5' AMP, *Plant Journal*, Vol 19, Issue 4, pp 433-439.
32. Tetlow IJ, Morell MK, Emes J. "Recent Developments in Understanding the Regulation of Starch Metabolism in Higher Plants". *Journal Experimental Botany*, vol. 55, pp. 2135- 2145, 2004.)
33. Tiessen A, Prescha K, Branschied A, Palacios N, Mckibbin R, Halford NG, Geigenberg P, 2003, Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar signaling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers, *The Plant Journal*, Vol. 35, Issue 4, pp. 490-500.

13. ANEXOS.

Secuencia de Primers empleados para amplificar la secuencia DPE1.

pET28bDPE1_EcoRI_Fwd : 5'-gaattctatgtcgttctacttaggccg-3'

pET28bDPE1_XhoI_Rev : 5'-ctcgagaagccgtccgtacaatgacaa-3'

Mapa del vector pET28b.

El tag 6-HIS se encuentra en el carboxilo de la proteína.

