UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CINASA SnRK2.6 EN PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana* CRECIENDO EN SUFICIENCIA Y DEFICIENCIA DE FÓSFORO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

RICARDO EMMANUEL CASTILLO TOBÓN

MÉXICO, D.F. **2014**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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: MIREYA RODRÍGUEZ PENAGOS**
VOCAL:	**Profesor: CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRÍGUEZ**
SECRETARIO:	**Profesor: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO**
1er. SUPLENTE:	**Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA**
2° SUPLENTE:	**Profesor: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E, LABORATORIO 105, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. BEATRIZ ALEJANDRA ÁVILA CASTAÑEDA _____

SUSTENTANTE:

RICARDO EMMANUEL CASTILLO TOBÓN _____

Índice General

Abreviaturas……...6

1. Introducción

1.1. Importancia del fósforo y déficit energético……..……7

1.2. Respuesta a deficiencia de fósforo……..……...7

1.2.1. Regulación morfológica y fisiológica……..……...8

1.2.2. Regulación metabólica……..……..8

1.2.3. Regulación génica…….……11

1.3. Familia de las proteínas cinasas SnRK´s…….……12

1.3.1. Subfamilia II de SnRK: SnRK2…….……13

1.3.2. Proteína cinasa SnRK2.6……..…15

1.3.2.1. Estructura proteica…….…15

1.3.2.2. Mecanismo de acción molecular de la cinasa SnRK2.6…….16

1.3.2.3. Señalización de deficiencia energética mediada por hormonas……...18

2. Antecedentes Inmediatos……..21

2.1. Hipótesis…….24

2.2. Objetivo general……24

2.2.1. Objetivos particulares……24

3. Materiales y métodos

3.1. Obtención de construcción de cDNA de la SnRK2.6 en el vector de expresión pGEX 4T-2……..25

3.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cDNA (SnRK2.6)……...25

3.1.2. Electroforesis en geles de agarosa para separar ácidos nucleicos……....25
3.1.3. Purificación de DNA de geles de agarosa…….26
3.1.4. Inserción de cDNA de la SnRK2.6 en el vector de clonación pGEM-T easy…….26
3.1.5. Transformación de células competentes DH5α……26
3.1.6. Inserción de cDNA SnRK2.6 en el vector de expresión pGEX 4T-2……..27
3.1.7. Transformación de células competentes BL21…….28

3.2. Expresión y purificación de proteína SnRK2.6…..…….….28
3.2.1. Expresión de proteína……28
3.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)……..29
3.2.3. Purificación de la proteína recombinante…….…..29
3.2.4. Cuantificación de proteína por el método colorimétrico de Bradford……..30

3.3. Obtención de anticuerpos a partir de conejos contra toda la subfamlia SnRK2 y específicamente contra la proteína SnRK2.6…….……31
3.3.1. Alineamiento de la subfamilia SnRK2s y síntesis de péptido especifico de la SnRK2.6…….……31
3.3.2. Inmunización de conejos……..31
3.3.3. Validación de anticuerpos……32

3.4. Determinación de SnRK2.6 en extracto de tejido de hoja y raíz de *Arabidopsis thaliana……..34*
3.4.1. Crecimiento de plantas Arabidopsis thaliana en suficiencia (+Pi) y deficiencia de fósforo (-Pi)……...34
3.4.2. Obtención de extracto proteico +Pi y -Pi……34

3.4.3. Inmunodetección de la SnRK2.6 en extractos hoja y raíz de *Arabidopsis thaliana*…….……35

3.5. Determinación de SnRK2.6 en cortes de tejido de hoja……36

4. Resultados

4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de SnRK2.6……..37

4.2. Inserción de cDNA SnRK2.6 en el vector de clonación pGEM-T easy..……..37

4.3. Inserción de SnRK2.6 en el vector de expresión pGEX 4T-2…….38

4.4. Expresión y purificación de proteína SnRK2.6……40

4.5. Obtención de anticuerpos a partir de conejos contra toda la subfamlia SnRK2 y específicamente contra la proteína SnRK2.6….……42

4.5.1. Alineamiento de la subfamilia SnRK2s y síntesis de péptido especifico de la SnRK2.6….……42

4.5.2. Validación de anticuerpos……42

4.6. Determinación de SnRK2.6 en extracto de tejido de hoja y raíz de *Arabidopsis thaliana*……43

4.7. Determinación de SnRK2.6 en cortes de tejido de hoja……48

5. Discusión de resultados……..50

5.1. Conclusiones……53

5.2. Perspectivas……..53

6. Bibliografía……..53

7. Anexo 1: Alineamiento de la subfamilia SnRK2……59

Abreviaturas

ABA: Ácido abscísico.
ABC: Transportadores de ABA.
ABFs: Factores de unión a ABRE.
ABI: Insensible a ABA.
ABRE: Elementos en respuesta a ABA.
ACP: Fosfatasas ácidas.
AREBPs: Proteínas de unión a elementos en respuesta a ABA.
At: Arabidopsis thaliana
ATP: Trifosfato de adenosina.
BSA: Albúmina de suero bovino.
CS: Citrato sintasa.
DAKOR: Medio fluorescente de montaje Dako.
HAB: Homólogo a ABI.
IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido.
KAT1: Transportador de potasio 1.
MDH: Malato deshidrogensa.
Os: Oryza sativa (arroz).
PAP: Fosfatasas ácidas moradas.
PBS: Solución amortiguadora de fosfatos.
PBST: Solución PBS y 0.1% de Tween 20.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
PEPC: Fosfoenol piruvato carboxilasa.
PHR1: Respuesta a deficiencia de fósforo 1.
PHT1: Familia de Transportadores de fósforo de alta afinidad 1.
Pi: Fósforo inorgánico.
PM: Peso molecular.
PP2C: Proteínas fosfatasas tipo 2C.
PSI: Genes inducidos por deficiencia de fósforo.
PT1: Transportador de fosfato.
PVDF: Polifluoruro de vinilideno.
PYR/PYL/RCAR: Receptores de ABA.
RNS1: Ribonucleasa 1.
SDS: Dodecil sulfato de sodio.
SIZ1: Gen con dominio SUMO/ Smt3 ligasa.
SLAC1: canal aniónico.
SnRK: Cinasas relacionadas a las no fermentadoras de sacarosa.

CAPÍTULO 1

1.1 Importancia del fósforo y déficit energético

Las plantas necesitan una serie de 13 elementos químicos que son esenciales para vivir y desarrollarse, dentro de los cuales el fósforo es el segundo más importante después del nitrógeno. A pesar de que se encuentra en cantidades abundantes en los suelos, su disponibilidad es baja, ya que su forma asimilable, el ion ortofosfato, está siempre en una concentración de 10 µM, por lo que las plantas crecen en deficiencia de fósforo a menos que se suplemente con fertilizantes (Fragoso *et al*. 2009; Panigrahy *et al*. 2009).

La importancia del fósforo radica en que es el sustrato clave para la formación de la molécula energética celular que es el ATP, también es uno de los principales constituyentes de los ácidos nucleicos, y en las membranas forman parte de los muchos fosfolípidos que conforman la bicapa lipídica. Además, es necesario en la división celular, en la formación de bio-membranas, en la formación de almidón y azúcar, en la germinación de las semillas, floración y formación del fruto, entre otras funciones. A nivel funcional, muchas enzimas y proteínas regulan su función y su localización dependiendo de su estado de fosforilación (Panigrahy *et al*., 2009).

1.2 Respuesta a deficiencia de fósforo

Las plantas que crecen en deficiencia de fósforo desarrollan cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que les permiten adaptarse a esas condiciones de estrés. Para que estas modificaciones se lleven a cabo, se necesita reprogramar la expresión genética (a través de cambios transcripcionales y postranscripcionales) y controlar la actividad y localización de proteínas y enzimas (a través de mecanismos postraduccionales). Todas estas modificaciones tienen la misma función: aumentar la cantidad de fósforo biodisponible (Plaxton & Tran, 2011).

1.2.1 Regulación morfológica y fisiológica.

La raíz es el órgano que modifica más fuertemente su morfología en respuesta a deficiencia de fósforo. La raíz primaria detiene su crecimiento y se favorece la aparición de raíces laterales y de pelos radiculares. El incremento en la longitud y la densidad de las raíces laterales y de los pelos radiculares tiene la función de aumentar el área de absorción, en la búsqueda de fuentes asimilables de fósforo. Además, la regulación positiva de transportadores de fósforo de alta afinidad en la membrana plasmática de las células de raíz (familia PHT1 en raíz de *Arabidopsis*) permite aumentar la eficiencia de asimilación. La expresión principal de estos transportadores es en la raíz, aunque también existen transportadores que envían el fosfato hacia las partes aéreas. A nivel de membrana plasmática la ausencia de fósforo produce un reemplazo en los fosfolípidos modificándose por sulfolípidos anfipáticos y galactolípidos, lo que genera un aumento en la recuperación de Pi y disminuye el consumo de Pi (Yuan & Liu, 2008; Panigrahy *et al*., 2009; Hu B., & Chu C. 2011; Plaxton & Tran, 2011).

1.2.2 Regulación metabólica.

Una respuesta universal en las plantas en deficiencia de fósforo es las regulaciones positivas de fosfatasas ácidas (ACP) intracelulares y secretadas, que hidrolizan monoésteres de Pi liberando y aumentando la disponibilidad de fósforo. Considerando que el contenido de fósforo orgánico en el suelo puede alcanzar hasta el 80%, la acción de estas enzimas es muy importante. En general, se ha observado que las fosfatasas alcalinas despliegan una mayor especificidad por su sustrato, mientras que las fosfatasas ácidas son generalmente no específicas (Plaxton & Tran, 2011).

En la figura 1 se esquematiza algunas adaptaciones metabólicas que ocurren en las plantas en deficiencia de fósforo, entre las cuales se encuentran la inducción de vías alternativas de glucólisis citosólica y del transporte de electrones, inducción de antocianinas (flavonoides que protegen los ácidos nucleicos de radiación UV) y pirofosfatasas, activación de hidrolasas que recogen

y reciclan Pi de compuestos orgánicos fosforados intra y extracelulares; inducción de la secreción de ribonucleasas (como RNS1 en *Arabidopsis*), nucleasas, fosfodiesterasas y fosfatasas ácidas (ACP) para degradar ácidos nucleicos del suelo y liberar Pi. También, las raíces secretan ácidos orgánicos (málico, cítrico y carboxilato) para liberar el fósforo que se encuentra quelado con metales como calcio, hierro y aluminio (fosfatos) y de la roca fosfato (Yuan & Liu, 2008; Fragoso *et al*., 2009; Panigrahy *et al*, 2009).

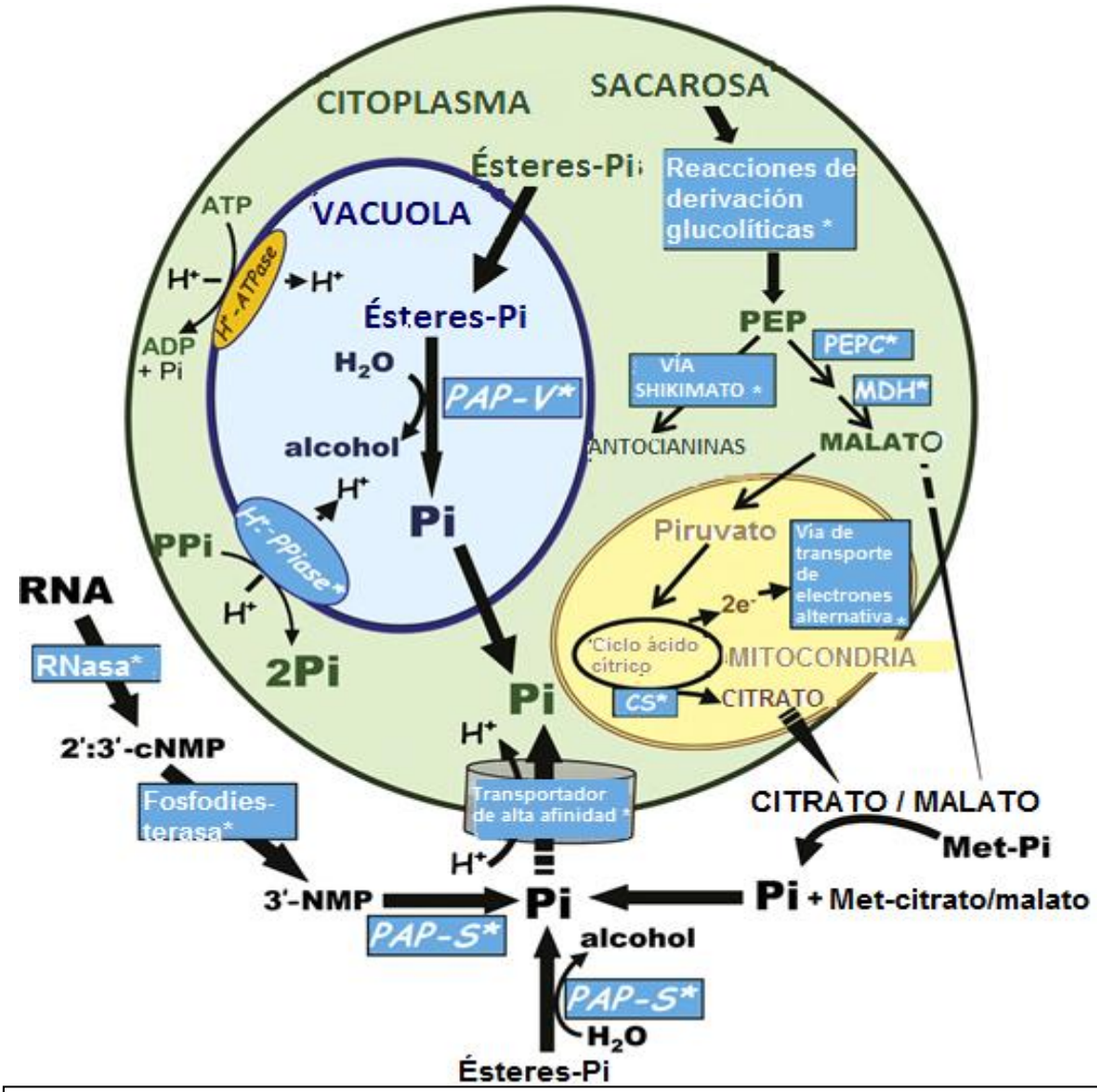


Figura 1: Modelo que muestra varios procesos metabólicos adaptativos (indicado por asteriscos) que pueden ayudar a las plantas a controlar la deficiencia nutricional de Pi. Vías alternativas de glicolisis citosólica, transporte de electrones mitocondrial y el bombeo de H^+ facilitan la respiración y el mantenimiento del pH vacuolar de las células vegetales –Pi porque niegan la dependencia de adenilatos y Pi, que bajan bruscamente su concentración en condiciones de deficiencia de fósforo. Grandes cantidades de ácidos orgánicos producidos por PEPC (fosfoenol piruvato carboxilasa), malato deshidrogenasa (MDH) y citrato sintasa (CS), pueden ser excretados por las raíces para aumentar la disponibilidad de Pi unido a minerales al solubilizar sales de fosfato de calcio, hierro y aluminio, y de Pi orgánico y a la susceptibilidad de éstos a la hidrólisis por PAPs (fosfatasas ácidas moradas, purple acid phosphatases) secretadas.

También, PAPs vacuolares (PAP-V) pueden reciclar Pi de monoésteres intracelulares no esenciales, mientras que las PAPs secretadas (PAP-S) recuperan Pi de monoésteres extracelulares y ácidos nucleicos, que eventualmente es recapturado por los transportadores de alta afinidad de Pi en la membrana plasmática.

1.2.3 Regulación génica.

A nivel de regulador transcripcional, el gen *Phosphate starvation response 1 (PHR1*) codifica a un factor de transcripción PHR1 con un dominio MYB de unión al ADN y un dominio de dimerización que predice la formación de homodímeros o heterodímeros. Es el regulador clave en la transducción de señales de vías metabólicas. Se conoce que PHR1 se une a elementos PIBS (una secuencia palindrómica imperfecta, GNATATNC, donde N puede ser A, T, G ó C) en la región promotora de algunos genes inducidos por deficiencia de fósforo (PSI, phosphate starvation induced por sus siglas en inglés) (Rubio *et al*., 2001; Hu B., & Chu C. 2011). Algunos de los genes que son regulados por este factor de transcripción y que comparten esa secuencia en su región promotora son la fosfatasa ácida *AtACP5*, la ribonucleasa *RNS1* y el transportador de fosfato *AtPT1,* que como se explicó en el punto 1.2.2 son enzimas que tienen un papel importante en la regulación metabólica por deficiencia de fósforo (Poirier & Bucher, 2002). La sobrexpresión de PHR1 lleva a la acumulación excesiva de Pi y la activación de genes PSI.

Un segundo gen involucrado en la regulación de la respuesta a la deficiencia de fósforo es *SIZ1* (SUMO/ Smt3 ligasa) quien codifica para una ligasa E3 SUMO que controla la sumoilación de PHR1. La sumoilación tiene varias acciones reguladoras, uno de los cuales es proteger a las proteínas de degradación mediante ubiquitinas (Hu B., & Chu C. 2011)

Algunas evidencias sugieren que la transducción de señales en condiciones de deficiencia de Pi está altamente conservada en arroz *y Arabidopsis.* Al igual que PHR1, OsPHR2 tiene un papel importante en la señalización de deficiencia de Pi en arroz, activa la expresión de genes inducidos por deficiencia de fósforo (PSI genes). Otro gen presente en arroz que modifica su expresión en condiciones en deficiencia de fósforo esn *OsPTF1* (*Oryza sativa* Pi-starvation induced transcription factor 1) que cuando se sobreexpresa aumenta la tolerancia a la deficiencia de fósforo (Yuan & Liu, 2008; Panigrahy *et al*., 2009; Rouached *et al.*, 2010; Chiou & Lin, 2011).

1.3 Familia de proteínas cinasas SnRKs

Las SnRKs (Sucrose non-fermenting (SNF) related kinase) pertenecen a una familia de proteínas cinasas que participan en la señalización en plantas y que han sido asociadas a la regulación del metabolismo de carbohidratos y a la respuesta de diferentes tipos de estreses abióticos, entre ellos deficiencia nutrimental de fósforo (Fragoso *et al.,* 2009). La familia está conformada por 3 subfamilias: SnRK1, SnRK2 y SnRK3. La subfamilia SnRK1 juega un papel importante en la regulación del metabolismo del carbono y del estado energético celular. La subfamilia 2 y 3 están implicadas en las vías de señalización mediadas por el ácido abscísico (ABA), calcio y estrés abiótico como sequía, salinidad, frío y osmolaridad (figura 2). A este respecto, uno de los ejemplos más descritos es la vía de señalización de SOS, en donde, una alta acumulación de Na^+ (alta salinidad) en el citoplasma desencadena una señal citosólica de Ca^{2+}, que es detectado por un complejo proteico de unión a calcio SnRK3/calcineurina B-like (SOS2/SOS3) generando una respuesta adaptativa al estimular a un transportador de Na (SOS1) que saca a este ion de la célula para conservar la homeostasis (Coello *et al*., 2012).

Por otro lado, la transducción de señales en respuesta a condiciones de sequía y altas temperaturas está mediada por lo hormona ABA, la cual activa diferentes genes que les permiten adaptarse a esas condiciones mediambientales. Algunas de estas señales están mediadas por la subfamilia de cinasas tipo SnRK2 (Coello *et al*., 2012).

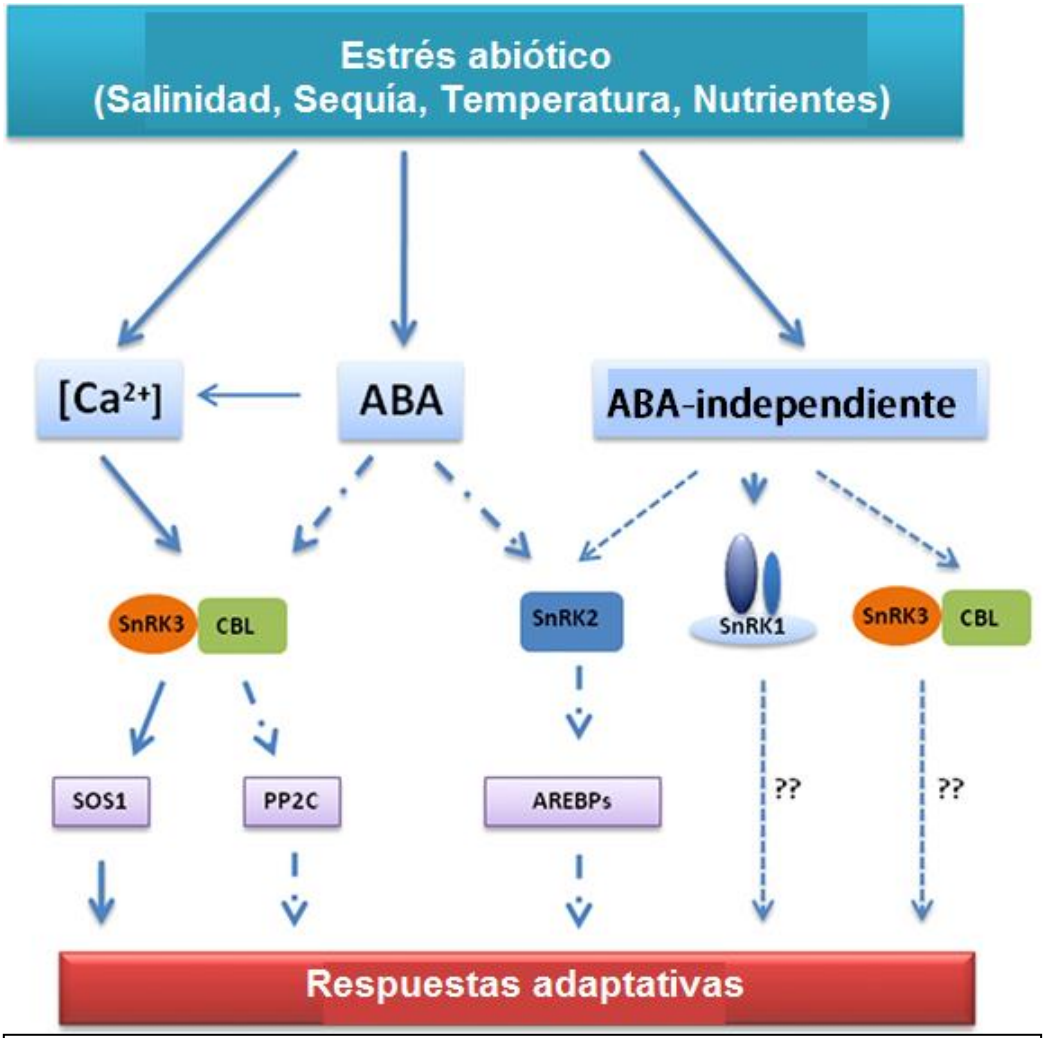


Figura 2: Diagrama esquemático que muestra las vías de señalización de estrés abiótico dependiente e independiente de ABA, así como de calcio, involucrando a la familia de las SnRK´s (Coello *et al*., 2012).

1.3.1 Subfamilia II de SnRK: SnRK2

Se han descrito 10 genes que dan origen a 10 isoformas de SnRK2 en *Arabidopsis thaliana*: SnRK2.1-SnRK2.10 ó SRK2A–SRKJ. Estas isoformas a su vez, se clasifican en tres grupos dependiendo de su respuesta al ácido abscísico (ABA) (figura 3). El grupo III es el que se regula positivamente por la acción del ABA, aumentando sus niveles después de la adición de dicha fitohormona (Mizoguchi *et al.*, 2010). Por otro lado, las isoformas que pertenecen al grupo I son activadas rápidamente en respuesta a estrés osmótico. Finalmente, el grupo II es activado por estrés osmótico y ABA (Umezawa *et al*., 2010; Xie *et al*., 2012).

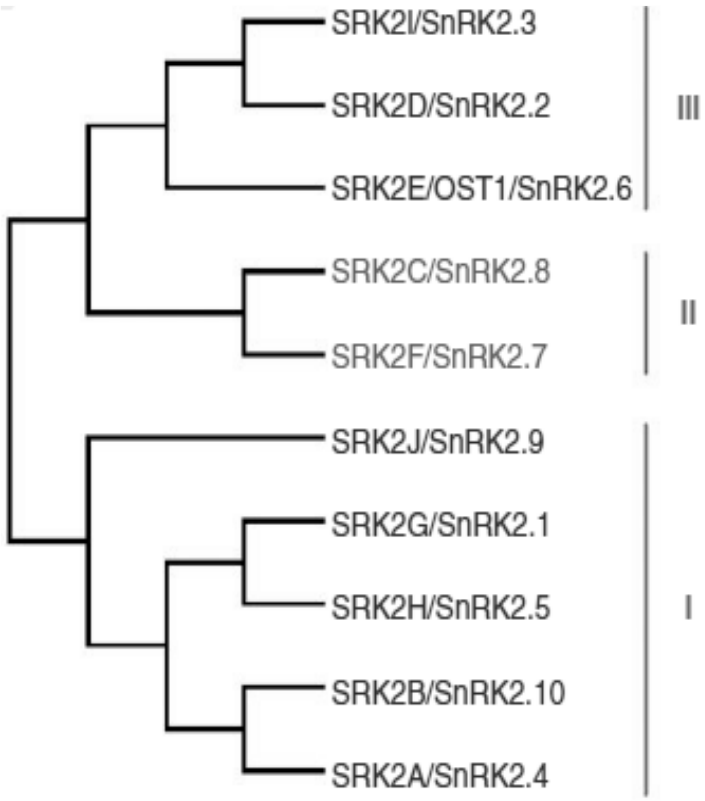


Figura 3: Árbol filogenético de la subfamilia SnRK2. Los miembros de la subfamilia SnRK2 están ordenadas en 3 grupos según el nivel de regulación por ABA: grupo III>II>I (Mizoguchi *et al*., 2010).

Los miembros del grupo III de SnRK2 (SnRK2.6/2.3/2.2) son reguladores positivos de la señal de ABA en *Arabidopsis thaliana*. Estas cinasas fosforilan a factores de transcripción responsables de la expresión de genes que responden a ABA, así como a canales iónicos que controlan la homeostasis osmótica como el canal aniónico SLAC1 y el canal de potasio KAT1, que finalmente llevan a cabo la protección de las plantas de deshidratación o alta salinidad mediante el cierre de los estomas. El mecanismo de acción de estas cinasas involucra una activación a través de la autofosforilación en un residuo de serina que se encuentra en el asa de activación (Kulik *et al*., 2011). En ausencia de estrés las SnRK2s son blancos de regulación negativa de proteínas fosfatasas tipo 2Cs (PP2C) que remueven el grupo fosfato, inactivando a la cinasa (Klingler, Batelli, & Zhu, 2010; Xie *et al*., 2012). El papel de las cinasas SnRK2.6/2.3/2.2 en la transducción de señales en respuesta a ABA se hizo evidente en estudios con triples mutantes *srk2d/e/i* en donde se observó una reducción drástica en la tolerancia a condiciones de estrés osmótico e hídrico. Además, estas plantas eran insensibles a ABA, lo que indica

que las SnRK2D/E/I son proteínas importantes en la regulación de la señalización en respuesta a ABA (Fujita *et al.*, 2009).

En cuanto a control metabólico, recientemente se descubrió que la SnRK2.6 participa en la regulación de la síntesis de aceites en semillas de *Arabidopsis,* síntesis de sacarosa y desaturación de ácidos grasos en hojas (Kulik *et al*., 2011)

1.3.2 Proteína cinasa SnRK2.6

1.3.2.1 Estructura proteica

La SnRK2.6 está funcionalmente divida en 3 dominios (figura 4): el dominio catalítico con actividad de cinasa donde está presente la serina[175] (residuos 21-282), el dominio de activación (residuos 283-318, dominio I) y el dominio C terminal de unión a la fosfatasa ABI1 (residuos 319-357, dominio II) (Xie *et al*., 2012). Así que la activación de la SnRK2.6 dependiente por ABA es a través del dominio II (Umezawa *et al*., 2010; Coello *et al*., 2011; Kulik *et al*., 2011)

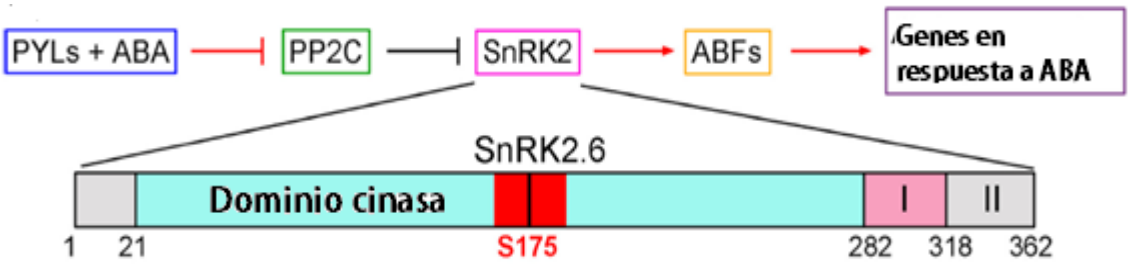


Figura 4: Diagrama esquemático de la estructura general de la SnRK2.6. Dominio de cinasa, Dominio I y Dominio II. Se muestra el bucle de activación (residuos 160-186) resaltado en rojo, donde está presente la serina[175] que es el sitio de autofosforilación (Xie *et al.,* 2012).

1.3.2.2 Mecanismo de acción molecular de la cinasa SnRK2.6

La señalización de ABA involucra tres tipos diferentes de proteínas, la familia de receptores a ABA denominados PYR/PYL/RCAR, las proteínas fosfatasas tipo 2C (PP2Cs) como ABI1, ABI2, HABI; y las cinasas del grupo III: SnRK2.2, 2.3 y 2.6. (Leung, 2012).

En ausencia de ABA, la PP2C inactiva a la SnRK2.6 por desfosforilación, de tal forma que en estas condiciones la señal se encuentra apagada. En presencia de ABA, el receptor PYR/PYL/RCAR atrapa a la fitohormona y es bloqueado por cambios conformacionales. Además, estos cambios conformacionales generan otro cambio en la superficie del receptor que facilita su unión con la PP2C, lo que provoca la liberación de la SnRK2.6 y su autofosforilación en la Ser^{175}, activándose. Estas cinasas regulan la acción de una familia de factores de transcripción denominados AREBPs (Proteínas de unión a elemento en respuesta a ABA; o ABFs, factores de unión a ABRE) quienes reconocen promotores que tienen secuencias denominadas ABRE (ABA response elements); (Leung, 2012) (Coello, Hey, & Halford, 2011). Las proteínas AREBPs o ABF fosforiladas se unen al elemento de respuesta a ABA (ABRE) en el promotor de genes que se estimulan en respuesta a la fitohormona. (Klingler *et al.*, 2010) .

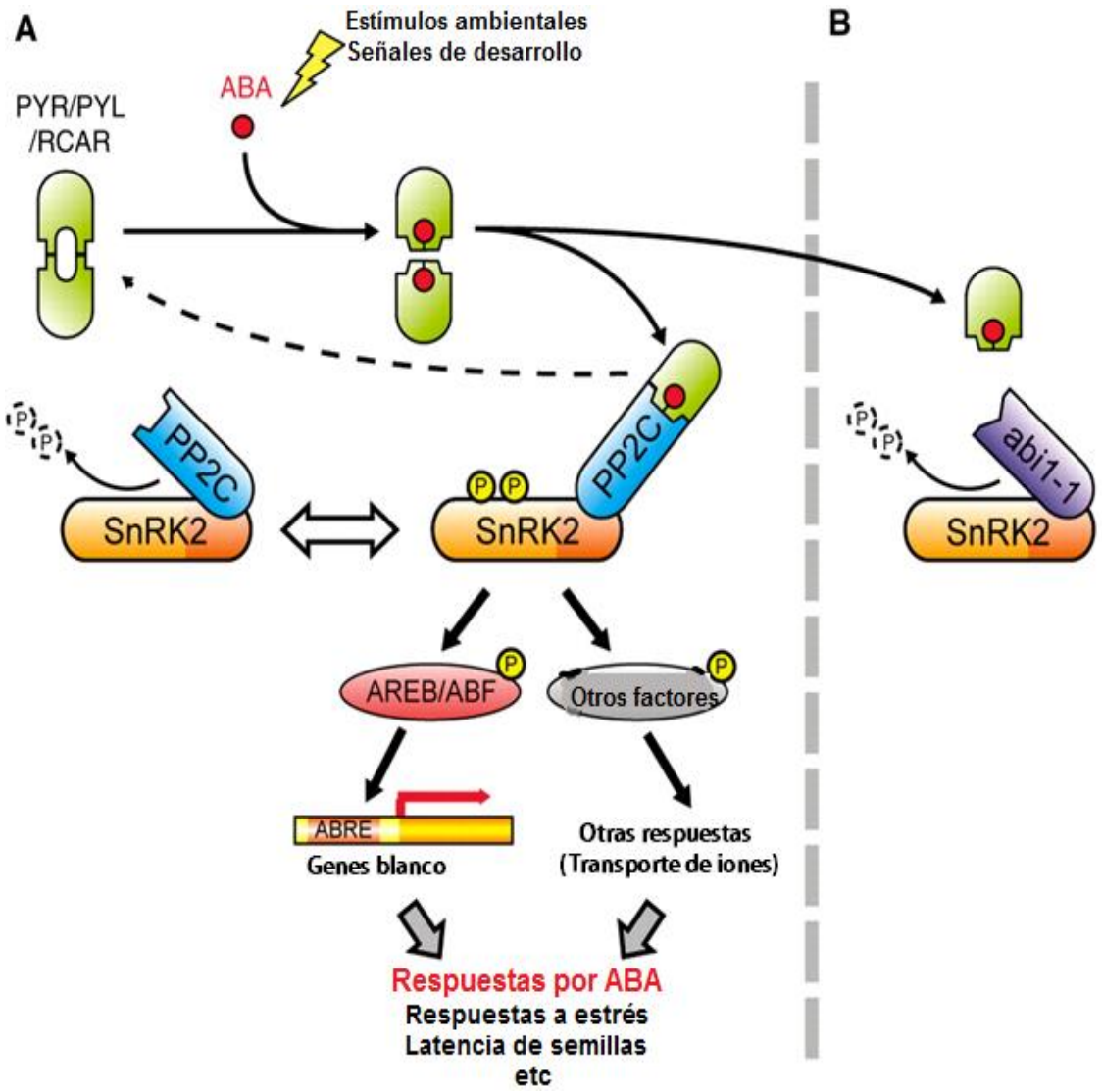


Figura 5: Modelo de la vía de señalización de SnRK2.6. (A) En condiciones normales, PP2C regula negativamente a la SnRK2 por interacciones directas y desfosforilación de residuos de SnRK2. En estrés abiótico o en presencia de gran cantidad de ABA endógeno, el ABA se une a su receptor PYR el cual interactúa con PP2C para inhibir la actividad de la proteína fosfatasa. Así, SnRK2 se libera de la regulación de PP2C y se activa para fosforilar factores de transcripción ABF o proteínas de membrana que involucran canales iónicos. (B) En contraste, la proteína mutada abi1 tipo 1 no se puede unir al receptor de ABA, lo que resulta en la inactivación constitutiva de SnRK2, incluso en la presencia de ABA (Umezawa *et al.*, 2010).

1.3.2.3 Señalización de deficiencia energética mediada por hormonas.

Varias hormonas se han implicado como mediadoras de las respuestas de las plantas a la deficiencia de fósforo, entre ellas el ácido abscísico (ABA). El ABA es una fitohormona que juega un papel central en el desarrollo de las plantas al promover la maduración de las semillas, impedir la germinación y restringir la pérdida excesiva de agua durante el crecimiento vegetativo (Leung, 2012), además regula el desarrollo de plántulas y apertura de estomas (Xie *et al.*, 2012).. Su función es muy importante en la adaptación de las plantas a diferentes estreses abióticos como la deshidratación y la salinidad (Klingler *et al.*, 2010). En la figura 6 se muestran las principales vías de señalización de ABA dentro de la célula: el equilibrio entre el catabolismo y la biosíntesis de ABA es lo que regula el transporte de ABA del exterior al interior de la célula a través de transportadores ABC; una vez dentro de la célula, la fitohormona puede actuar en dos compartimentos celulares: en el núcleo o en citoplasma. En el núcleo el complejo ABA–PYR/PYL/RCAR–PP2C–SnRK2.6 regula directamente la expresión de genes en respuesta a ABA mediante la fosforilación de factores de transcripción tipo AREB/ABF. Mientras que en el citoplasma, el complejo de señalización puede acceder a la membrana plasmática y fosforilar canales aniónicos (SLAC1) o canales de potasio (KAT1) para inducir el cierre de estomas como se explica en la sección 1.3.1.

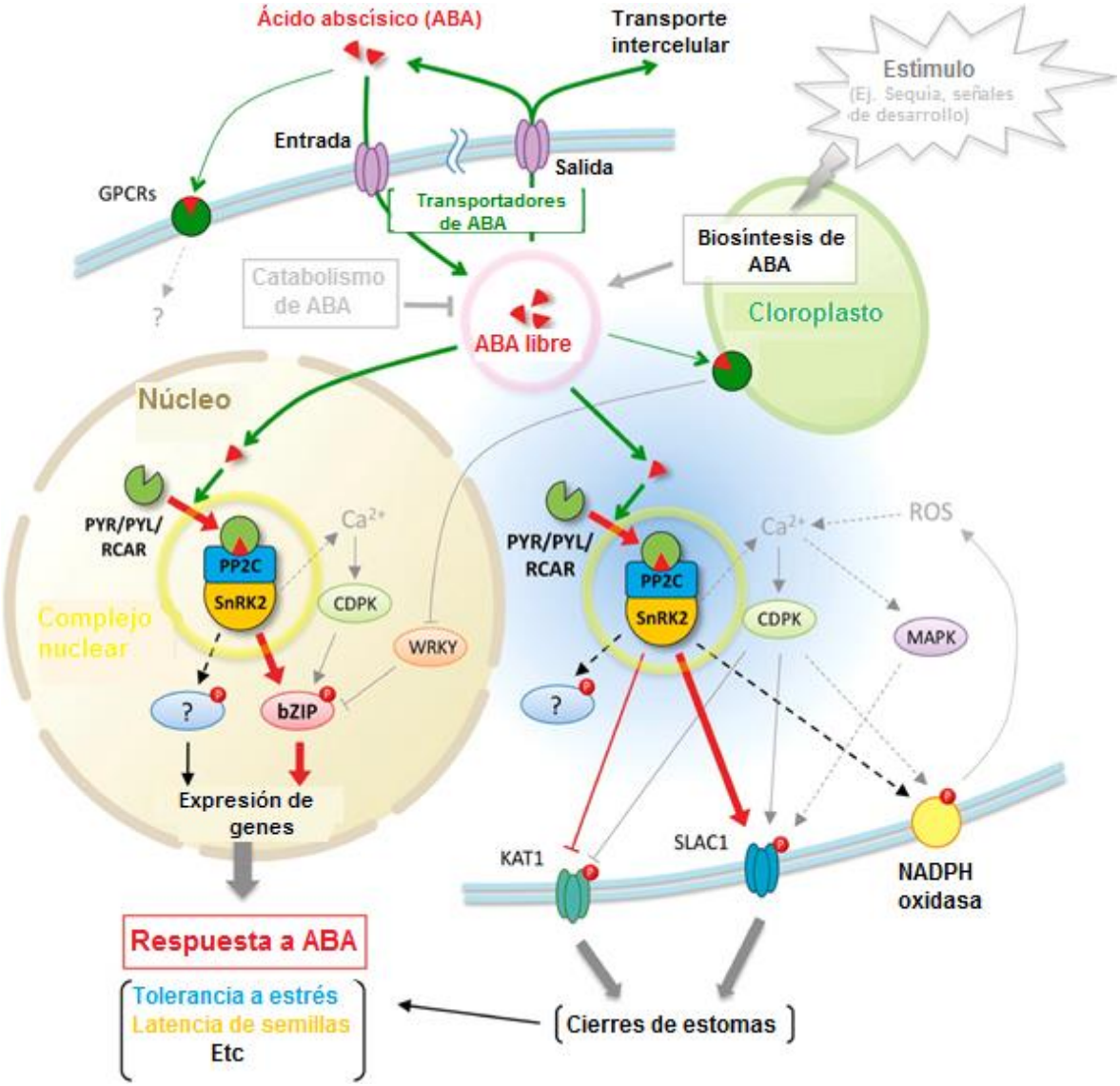


Figura 6: Esquema general de vía de señalización de ABA. Se muestra el transporte de ABA del exterior al interior de la célula a través de transportadores ABC; una vez dentro de la célula la fitohormona puede actuar en dos compartimientos: en el núcleo o en citoplasma. En el núcleo el complejo ABA–PYR/PYL/RCAR–PP2C–SnRK2 regula directamente la expresión de genes en respuesta a ABA mediante la fosforilación de factores de transcripción tipo AREB/ABF. Mientras en el citoplasma, el complejo de señalización puede accesar a la membrana plasmática y fosforilar canales aniónicos (SLAC1) o canales de potasio (KAT1) para inducir el cierre de estomas en respuesta a ABA (Umezawa *et al.*, 2010).

Su participación en la señalización a otros tipos de estreses no es clara, pero se ha especulado que la señalización por ABA está involucrada en las respuestas a la inanición de fosfato, principalmente porque existen algunas similitudes en el patrón de crecimiento entre éstas plantas y las que se les administra ABA exógenamente. Además, ambas plantas desarrollan una alta densidad de pelos radiculares. Dentro de las pocas evidencias moleculares que existen, se sabe que el ABA puede inhibir la expresión de algunos genes que se estimulan por deficiencia de fósforo y se propone que esta regulación podría llevarse a cabo a través del control de la fosfatasa PP2C, ABI1. Si esto es así, cabe la posibilidad que las cinasas SnRK2, en particular las de la clase III, pudieran estar involucradas en la respuesta a la falta energética promovida por la deficiencia de fósforo (Chiou y Lin, 2011).

CAPÍTULO 2

Antecedentes inmediatos

Resultados obtenidos en nuestro grupo de trabajo, han indicado que miembros de la familia SnRK1 participan en la respuesta de las plantas al estrés energético. En particular, se ha encontrado que algunas de las subunidades del complejo se expresan a nivel de proteína durante estas condiciones, pero existe una regulación específica sobre las subunidades catalíticas (Guerrero, 2012). Estas cinasas regulan la expresión de muchos genes que tienen que ver con vías metabólicas, inhibiendo aquellas que producen un gasto de energía y estimulando a las que producen ATP (Fregoso *et al*., 2009).

En el caso de las cinasas de la familia SnRK2, se ha observado que su expresión en diferentes condiciones nutrimentales varía de forma importante. Microarreglos disponibles en la base de datos de Genevestigator indican que en deficiencia de fósforo uno de los miembros del grupo III, SnRK2.6, aumenta su expresión (Fig. 7), sin embargo, este estudio se realizó a nivel de transcrito y la correlación con la cantidad de proteína no se ha estudiado.

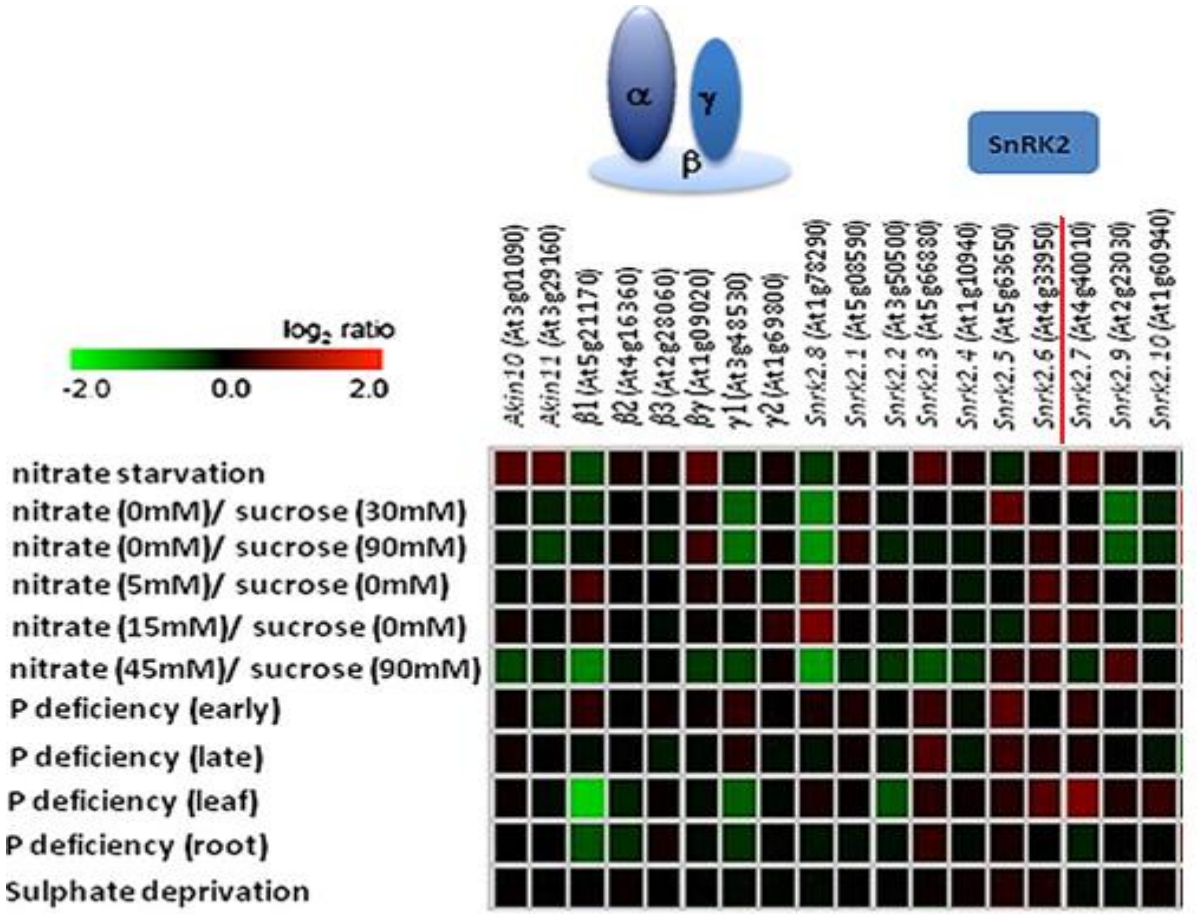


Figura 7: Microarreglo de la expresión de genes que codifican SnRK1 y SnRK2 en diferentes condiciones de deficiencia nutrimental. (Modificado de Coello *et al.,* 2011).

Adicionalmente, a partir de un fraccionamiento proteico de tejido de hoja de *Arabidopsis* en deficiencia y suficiencia de fósforo, se encontró, que existen dos zonas de alta actividad de cinasas de la familia SnRK (Figura 8), una de ellas de peso molecular (PM) entre 200 - 150 kDa, que corresponde a las cinasas SnRK1, mientras que el pico de actividad con un peso menor a 150 kDa, corresponde a cinasas tipo SnRK2. Estos estudios iniciales, no distinguían entre las 10 isoformas de estas cinasas, por lo que cabe la posibilidad que entre las que se activan se encuentre la cinasa SnRK2.6.

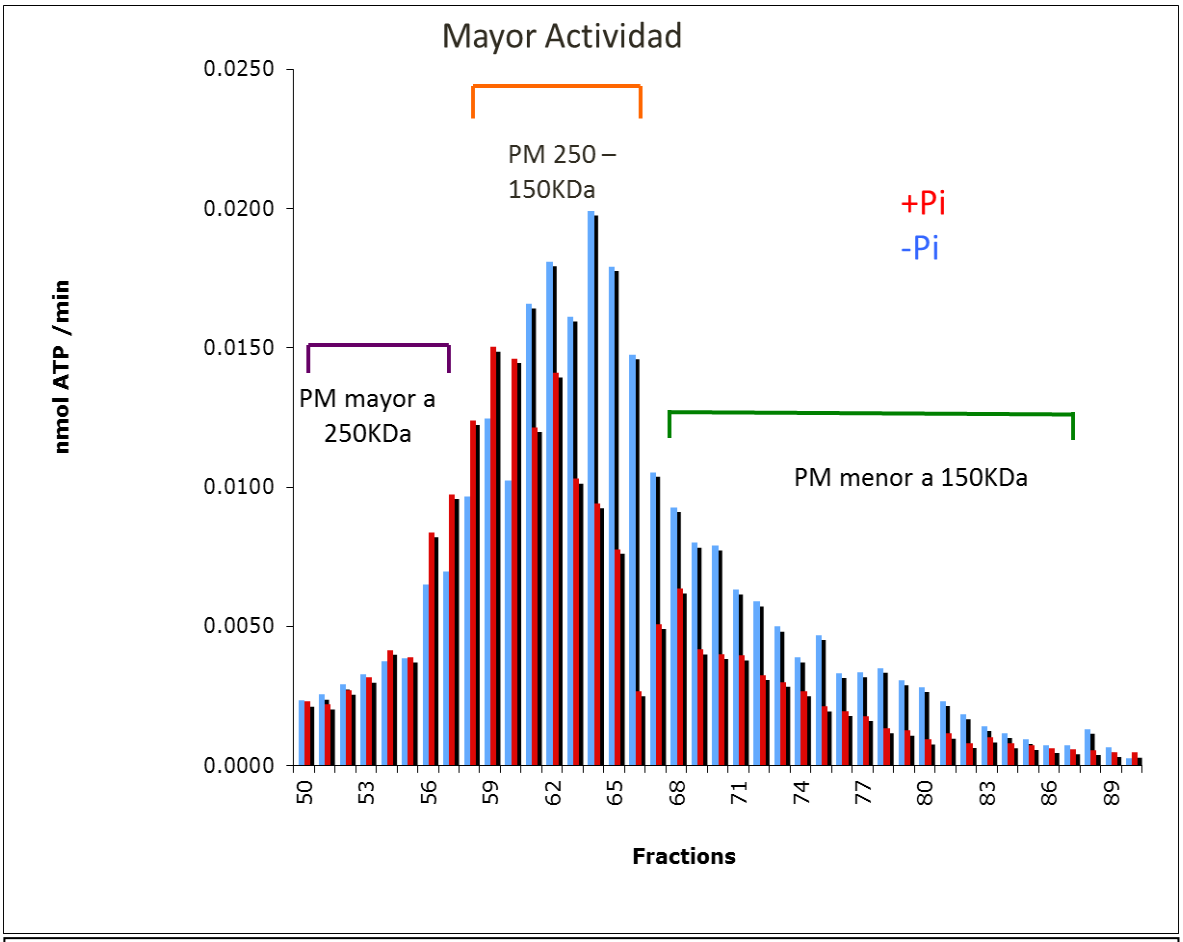


Figura 8: Ensayo de actividad de cinasa con el péptido AMARA de fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular de extracto proteico de hojas de *Arabidopsis thaliana* creciendo en deficiencia y suficiencia de fósforo (Guerrero, 2012).

2.1 Hipótesis

La cantidad de proteína SnRK2.6 y/o su localización está regulada por el déficit energético producido por deficiencia de fosfato en plantas de *Arabidopsis thaliana.*

2.2 Objetivo general

Determinar la influencia que tiene el déficit energético en la cantidad y/o localización de la proteína SnRK2.6 de *Arabidopsis thaliana*.

2.2.1 Objetivos particulares

1. Obtener el cDNA que codifica para la proteína SnRK2.6 en un vector de expresión.
2. Expresar y purificar la proteína recombinante SnRK2.6 en *E. coli.*
3. Obtener anticuerpos específicos contra la proteína SnRK2.6
4. Identificar a la SnRK2.6 en tejidos de hoja y raíz de *Arabidopsis* creciendo en suficiencia y deficiencia de fósforo.
5. Realizar inmonohistoquímicas en cortes de tejidos de raíz y hojas de *Arabidopsis thaliana* crecidos en condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo.

CAPÍTULO 3
Materiales y métodos

3.1 Obtención de la construcción de cDNA de la SnRK2.6 en el vector de expresión pGEX 4T-2.

3.1.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cDNA (SnRK2.6)

Se obtuvo el cDNA de *SnRK2.6* de la organización The Arabidopsis Information Resource (TAIR) en el vector pEntSD/TOPO: SnRK2.6. A partir de este cDNA se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes cebadores:

SnRK2.6 Forward 5´GGGGGATCCATGGATCGACCAGCAGTG 3´

SnRK2.6 Reverse 5´AATGCGGCCGCTCACATTGCGTACACAAT 3´

La mezcla de reacción fue: 5 µL de amortiguador de PCR 10X, 1 µL DNTP´s (10 mM), 1 µL primer forward (10 mM), 1 µL primer reverse (10 mM), 1 µL cDNA SnRK2.6 (1µg/µL), 0.3 µL Taq Polimerasa (5000 U/mL), en un volumen final de 50 µL. La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 98 °C por 2 minutos, 30 ciclos con periodos de 98 °C por 0.2 min, 50 °C por 0.3 min, 72 °C por 3 min; con una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Los cebadores también sirvieron para añadir sitios de restricción en los extremos del cDNA. En el forward se añadió el sitio *BamHI* y en el reverse el *NotI*.

3.1.2 Electroforesis en geles de agarosa para separar ácidos nucleicos.

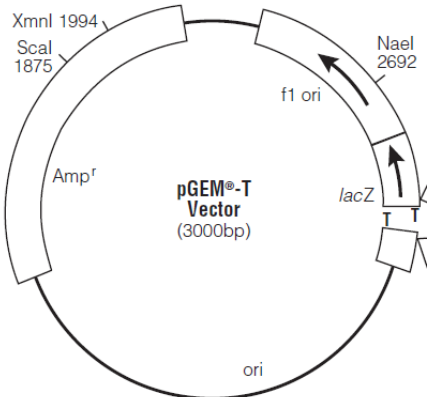
Los geles se prepararon al 1% de agarosa en solución amortiguadora TAE 1X (40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA pH 8.0 y 1 µg/mL bromuro de etidio). Las muestras se prepararon agregando amortiguador de carga 1X (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilen cianol. 0.25% ficoll 400). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje de 85 V.

3.1.3 Purificación de DNA de geles de agarosa.

El fragmento amplificado por PCR se purificó utilizando el kit comercial PureLinkTM Quick Gel Extraction (Invitrogen) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Después de la purificación, el fragmento se analizó en un gel de agarosa para revisar la recuperación.

3.1.4 Inserción del cDNA de la SnRK2.6 en el vector de clonación pGEM-T easy.

La reacción de inserción se realizó a un volumen final de 10 µL: 5 µL de buffer inserción 2X, 1 µL de vector pGEM-T easy (50 ng), 1µL de enzima T4 DNA ligasa (3 U/µL) y 3 µL de producto de PCR SnRK2.6. Se dejó incubando toda la noche a 4 ºC. La reacción se utilizó para transformar células competentes DH5α.



Estructura del vector pGEM. Promega, 2010.

3.1.5 Transformación de células competentes DH5α.

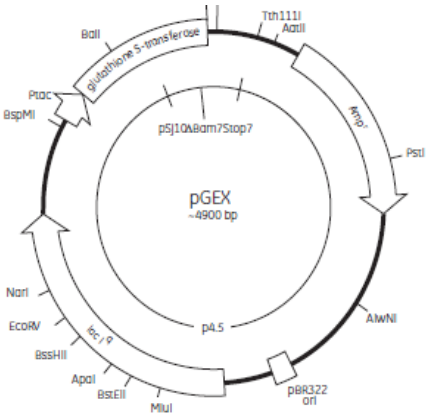
En una alícuota de 100 µL de bacterias competentes *E. coli* DH5α se agregó 5 µL del vector con SnRK2.6 clonado. Las células se incubaron en hielo durante 15 minutos, y se les aplicó un choque térmico a 42 ºC por un minuto. Las células se colocaron en hielo y se les agregó 500 µL de medio Luria Bertani (LB: Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L). Las células se agitaron a 37 ºC por una hora. Para seleccionar a las transformantes, se tomaron 100 µL del cultivo y se colocaron en una caja con medio LB con ampicilina (100 µg/mL), 10 µL de X-Gal (50 mg/mL) e IPTG (0.1 M). La caja se incubó toda la noche a 37 ºC.

De la mezcla de las colonias, se seleccionaron 5 blancas y se hicieron cultivos en 5 mL de medio líquido LB/Ampicilina. Los cultivos se incubaron toda la noche a 37 ºC en agitación constante. La purificación de los plásmidos que contienen los insertos de interés se realizó utilizando el kit comercial GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

Para corroborar que la inserción haya sido efectiva, se realizó un ensayo de digestión con las enzimas de restricción *BamHI* (New England Biolabs Inc.) y *NotI* (Invitrogen), la mezcla de reacción fue la siguiente: 1 µL *BamH1* (20 U/µL), 1 µL *Not1* (10 U/µL), 1 µL de Buffer O 10X (Invitrogen), 2 µL H2O estéril y 5 µL de plásmido purificado (200 ng/µL). La reacción se incubó toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se analizó la digestión en una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.1.6 Inserción del cDNA SnRK2.6 en el vector de expresión pGEX 4T-2.

De la digestión del pGEM-SnRK2.6 con las enzimas *BamH1* y *NotI*, se purificó el inserto SnRK2.6 del gel de agarosa tal como se describió anteriormente. Después de verificar en un gel de agarosa la recuperación del fragmento, se realizó la siguiente inserción con el vector pGEX 4T-2. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 20 µL: 2 µL de inserto purificado (aproximadamente 100 ng/µL), 3 µL vector pGEX 4T-2 (previamente digerido con *BamHI* y *NotI*, y desfosforilado con fosfatasa alcalina por 30 min a 37 °C, a una proporción aproximada de 2:1 vector:inserto), 2 µL buffer de ligasa 10X, 1 µL T4 DNA ligasa (3 U/µL) y 12 µL de H2O estéril. La reacción se incubó toda la noche a 4 °C.



Estructura del vector pGEX-4T2.
GE Healthcare, 2009.

Al día siguiente se transformaron células competentes DH5α con 10 µL del vector con el SnRK.26 clonado (de acuerdo al protocolo señalado en el punto 3.1.5), se crecieron en medio sólido LB/Ampicilina (100 µg/mL) durante toda la noche a 37 °C. Se seleccionaron colonias al azar y de cada preparación se purificó el plásmido con el kit comercial GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich).

Con el plásmido purificado se realizó un ensayo de digestión con las enzimas *BamH1* y *Not1* como se describió previamente, para verificar la liberación del inserto que corresponde al fragmento SnRK2.6.

3.1.7 Transformación de células competentes BL21.

Para iniciar los experimentos de expresión, se transformaron células de *E. coli* BL21 con la construcción pGEX-SnRK2.6, siguiendo el protocolo descrito para la transformación de células *E. coli DH5α*. También, se purificó el plásmido de las células y se realizó el ensayo de digestión para corroborar la transformación.

3.2 Expresión y purificación de la proteína SnRK2.6

3.2.1 Expresión de proteína.

De las colonias de bacterias BL21 transformadas se sembró un inóculo en medio líquido LB/Ampicilina y se dejó crecer toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se tomaron 0.5 mL del cultivo y se colocaron en tubos con 5 mL de medio LB/Ampicilina, se incubaron a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7 a una longitud de onda de 600 nm.Posteriormente, se dejaron incubando por 3 horas en agitación constante, con las siguientes condiciones:

Temperatura	**IPTG (mM)**		
30 °C	0	0.5	1
37 °C			

Los cultivos se centrifugaron a 6000 rpm (5636 RCF) a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y las pastillas bacterianas se resuspendieron en 1 mL de PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na2PO4, 18 mM KH2PO4, 0.1%) y PMSF 1 mM. Las células se sonicaron 2 veces durante 15 segundos a una amplitud de 25% (Sonicador: Sonics Vibra Cell). La muestra se centrifugó durante 10 minutos a 6000 rpm (5636 RCF), para separar la fracción soluble de la insoluble. Cada una de las fracciones, se mezcló con buffer de carga 4X, se desnaturalizaron por 5 min a 90 °C y se separaron en una electroforesis SDS-PAGE.

3.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se utilizaron 15 µg de proteína purificada y se mezclaron con amortiguador de carga 4X (Tris 1 M pH 6.8, glicerol, 1% SDS, 10% azul de bromofenol, DTT). Las proteínas se desnaturalizaron a una temperatura de 100 °C durante 5 minutos y se cargaron en un gel SDS-PAGE que tenía un gel separador al 12% y un concentrador al 3%. La electroforesis se corrió a un voltaje de 120 V hasta que el frente de corrida llegó al final del gel.

3.2.3 Purificación de la proteína recombinante

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la expresión de proteína recombinante, se procedió a escalar la metodología. Se realizó la expresión en 2 matraces de 2 L con 500 mL de medio LB/Ampicilia, con 1 mM IPTG, a 37 °C por 3 horas. El cultivo se centrifugó por 5 minutos a 6000 rpm (5870 RCF), se descartó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron con 30 mL de PBS/PMSF 1 mM. Se agregó 600 µL de Tris-HCl pH 8.8 y 30 mg de lisozima y la mezcla bacteriana se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a sonicar 4 veces por 15 segundos con una amplitud de 25% (Sonicador: Sonics Vibra Cell). Se tomó una muestra de la fracción total (extracto crudo) y, se centrifugó a 13000 rpm (10800 RCF) por 15 minutos. La fracción soluble se colectó para continuar con la purificación.

La columna de afinidad utilizada, Glutatión-Agarosa (Sigma-Aldrich) se equilibró con 10 mL PBS pH 7.4. La mezcla resina-fracción soluble se incubó en agitación por 1 hora a 4 °C.

Pasado el periodo de incubación, la mezcla se centrifugó a velocidad baja (5636 RCF) 10 minutos, y se tomó una muestra del sobrenadante (fracción no unida). La resina se resuspendió con 3 mL de PBS y se colocó nuevamente en la columna. La columna se lavó con 5 volúmenes de PBS y las proteínas unidas se eluyueron con 10 mL de amortiguador de elución que contenía 50 mM Tris, 10 mM glutatión, pH 8.0. Se recolectaron fracciones de 1 mL que se analizaron en una electroforesis SDS-PAGE.

3.2.4 Cuantificación de proteína por el método colorimétrico de Bradford.

Para conocer la cantidad de proteína purificada se empleó el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). El stock 5X del reactivo de Bradford se preparó de la siguiente forma: 100 mg de azul de Coomassie G-250 disuelto en 50 mL de etanol al 95% y 100 mL de ácido fosfórico concentrado; la mezcla se aforó con agua destilada a 200 mL y se filtró a través de papel Whatman No. 1. De este stock se realizó una disolución para obtener Bradford 1X.

Para la cuantificación de las proteínas, se preparó una curva patrón con solución de Albúmina de Suero Bovino (BSA) partiendo de una solución concentrada de BSA (1 mg/mL), siguiéndose la siguiente tabla:

µL H2O	**µL BSA (1 mg/mL)**	**µL Bradford**	**Concentración de Proteína (µg/µL)**
20	0	980	0
18	2	980	0.1
16	4	980	0.2
12	8	980	0.4
8	12	980	0.6
4	16	980	0.8

Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Ultrospec, 2000) a una longitud de onda de 595 nm utilizando una celda de plástico de 1 mL. Las absorbancias obtenidas en la curva patrón se graficaron contra la concentración de proteína de cada una de ellas. Se obtuvo la ecuación de una recta Y = mX + b, donde Y es la absorbancia, X es la concentración de proteína, m es la pendiente y b la ordenada al origen, además, se determinó la linealidad de la recta (valor de r).

Para determinar la concentración de proteínas de las muestras a analizar, se mezclaron 10 µL de muestra con 10 µL de H2O y 980 µL de reactivo de Bradford. Se midió la absorbancia y posteriormente, se interpoló el valor en la ecuación de la recta de la curva patrón.

3.3 Obtención de anticuerpos a partir de conejos contra toda la subfamlia SnRK2 y específicamente contra la proteína SnRK2.6

3.3.1 Alineamiento de la subfamilia SnRK2s y síntesis de péptido especifico de la SnRK2.6

Para identificar una región específica de la SnRK2.6, se utilizaron las secuencias de aminoácidos de la subfamilia SnRK2 obtenida de la página del TAIR (http://www.arabidopsis.org/) y se realizó un alineamiento múltiple con el programa TEXSHADE ubicado en el portal SDSC: San Diego Supercomputer Center, Biology WorkBench (http://workbench.sdsc.edu/).

La secuencia de aminoácidos específica para la SnRK2.6 elegida unida a Hemaglutinina fue sintetizada por Genescript.

Por otro lado, la proteína recombinante completa se utilizó como antígeno para inmunizar conejos. Los anticuerpos obtenidos a partir de esta estrategia, tendrán la capacidad de reconocer a varios miembros de la familia.

3.3.2 Inmunización de conejos.

Se trabajó con 4 conejos machos, que se clasificaron como Conejo 1, 2, 3 y 4. Estos conejos se mantuvieron en 4 jaulas individuales de longitudes de 65 cm largo, 40 cm alto, 44 cm ancho y se hicieron revisiones 2 veces por semana de texturas de pelo. El peso inicial de los conejos fue de: Conejo 1: 2,1 kg; Conejo 2: 2,2 kg; Conejo 3: 2,3 kg; Conejo 4: 2,3 kg

El diseño de inmunización fue con dos tratamientos:

a) Conejo 1 y 2: Proteína Full con acrilamida como adyuvante. Este representaba a la proteína recombinante completa de SnRK2.6 que se obtuvo cortando la banda de acrilamida después de una electroforesis SDS-PAGE. Aproximadamente 1 mg de proteína fue utilizado en el esquema de inmunización.
b) Conejo 3 y 4: Péptido Parcial, sintetizado por la empresa “Genescript”, con Adyuvante completo o incompleto de Freund en proporción 1:1.

Las vías de administración empleadas fueron la vía subcutánea y el ganglio poplíteo.

La inmunización se hizo por 36 días, de acuerdo al siguiente esquema:

Esquema de inmunización		
Día 1	**Día 6**	**Día 13**
• Sangría inicial de todos los conejos. • 0.2 mL de proteína Full en ganglio Poplíteo • 1.5 mL de péptido Parcial/Adyuvante incompleto vía subcutánea.	• 0.3 mL de proteína Full/Acrilamida en ganglio poplíteo. • 1.5 mL de péptido Parcial/Adyuvante completo vía subcutánea.	Administración vía subcutánea para la proteína Full y el péptido Parcial.

Esquema de inmunización		
Día 25	**Día 29**	**Día 36**
Administración vía subcutánea para la proteína Full y el péptido Parcial.	Sangría de prueba (3 mL) para todos los conejos	Punción cardíaca.

3.3.3 Validación de anticuerpos.

Para determinar la especificidad de los anticuerpos obtenidos, la proteína recombinante purificada se transfirió a una membrana de polivinildenofluoruro (PVDF, Immobilion-P Milipore) con un amortiguador de transferencia que contenía 124 mM Tris-HCl, 96 mM glicina y 20% v/v metanol durante una hora a 100 V. Al final de la transferencia, las proteína se tiñeron con Rojo de Ponceau (0.1% Rojo Ponceau, 5% ácido acético), para corroborar su presencia en la membrana.

La membrana se bloqueó con PBS + Tween 20 (PBST: PBS y 0.1% Tween 20) y 5% de leche descremada durante 1:30 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. El primer anticuerpo procedente del suero de conejo inmune, tanto para todas las SnRK2´s (anticuerpo Full) como para la SnRK2.6 (anticuerpo parcial) se agregó a una dilución de 1:50000 en ambos casos y se dejó incubando en agitación toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBST cada 10 min y se agregó el anticuerpo secundario asociado a una peroxidasa (Sigma-Aldrich) a una dilución 1:20000 en PBST, en agitación constante durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron otros 3 lavados cada 10 minutos con PBST.

La membrana se reveló con el kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Milipore) siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

3.4 Determinación de SnRK2.6 en extracto de tejido de hoja y raíz de *Arabidopsis thaliana.*

3.4.1 Crecimiento de plantas *Arabidopsis thaliana* en suficiencia (+Pi) y deficiencia de fósforo (-Pi).

Se desinfectaron semillas de *Arabidopsis thaliana* tipo silvestre con una solución de hipoclorito de sodio 50% (v/v) y Tween 20 al 0.01% (v/v) durante 5 minutos. Posteriormente, se lavaron con agua estéril dejando reposar por 1 minuto, repitiendo el lavado 10 veces. Se depositaron entre 20 a 25 semillas por frasco de vidrio con medio Gamborg B-5 (Sigma Aldrich), 1% de sacarosa y pH 5.3-5.4. Las semillas se incubaron durante 24 h a 4°C y posteriormente se transfirieron a una cámara de crecimiento a 25 °C con agitación moderada (150 rpm) durante 7 días. Después de la primera semana de crecimiento, se cambió el medio de los frascos por una disolución de Hoagland con fosfato que contenía 0.5 mM $(NH_4)_2PO_4$, 6 mM KNO_3, 4 mM $Ca(NO_3)*H_2O$, 2 mM $MgSO_4*7H_2O$, 9 µM $MnCl_2*4H_2O$, 46 µM H_3BO_3, 8 µM $ZnSO_4*7H_2O$, 3 µM $CuSO_4*5H_2O$, 1 Mm $H_2MoO_4*H_2O$, 0.01 g/L Fe(III)-EDTA, 0.0575 g/L $NH_4H_2PO_4$. Transcurrida otra semana de crecimiento, se cambiaron los medios, dividiendo el total de frascos en partes equitativas con Hoagland con fosfatos (+Pi) y Hoagland sin fosfatos (-Pi). El tratamiento se sostuvo durante una semana adicional. Transcurrido ese tiempo, las plantas se cosecharon y se separaron las hojas y raíces de las plantas. El tejido vegetal se congeló con nitrógeno líquido y se conservó a -70 °C hasta su utilización.

3.4.2 Obtención de extracto proteico +Pi y -Pi.

Se pesó 1 g de tejido (+P ó –P), y se colocó en un mortero previamente enfriado, después se agregó 1.5 mL de la disolución de extracción que contenía 50 mM tricina pH 8.0, 50 mM floruro de sodio (NaF), 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1 mM ácido tetraacético etilenglicol (EGTA), 1 mM ditiotreitol (DTT), 1 mM benzamidina, 1 mM floruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 0.02% Brij 35, 10% glicerol, 2% polivinilpirrolidona (PVPD) e inhibidor de fosfatasas 1X (50 mM NaF, 25 mM b-glicerolfosfato, 10 mM pirofosfato de sodio, 2 mM ortovanadato de

sodio). El tejido se maceró hasta obtener una mezcla lo menos densa posible y se centrifugó a 4 °C a una velocidad de 14000 rpm (20800 RCF), por 15 min. Las proteínas del sobrenadante se cuantificaron mediante el método colorimétrico de Bradford y, una cantidad de proteína se dejó precipitando con acetona toda la noche a -20 °C.

Al día siguiente, la mezcla proteica se centrifugó a 14000 rpm (20800 RCF), 4 °C, durante 15 min y la pastilla proteica se resuspendió en amortiguador de carga para SDS-PAGE obteniendo una solución con una concentración final de proteína de 1 µg/µL.

3.4.3 Inmunodetección de SnRK2.6 en extractos de hoja y raíz de *A. thaliana*

Se realizaron electroforesis SDS-PAGE con 30 µg de proteína de extracto +Pi y –Pi, en geles de acrilamida al 12%. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas PVDF y se analizaron con los anticuerpos Full (dilución 1:170000) y Parcial (dilución 1:50000).

Para corroborar que las bandas detectadas por los anticuerpos fueran las de interés, se realizaron ensayos utilizando los anticuerpos bloqueados con el péptido específico. Para el anticuerpo Parcial se realizaron los siguientes ensayos, manteniendo constante el péptido sintetizado:

Dilución final de anticuerpo	Péptido sintetizado 1 µg/mL (µL)	Anticuerpo, diluido 1:10 (µL)	PBS 1X (µL)
1:100	50	10	40
1:50	50	20	30
1:80	50	12.5	27.5

En cuanto al anticuerpo Full, el ensayo de bloqueo se realizó con 13.5 µg de proteína recombinante purificada, 5 µL de suero inmune diluido 1:10 y 45 µL de PBS, la dilución final del anticuerpo fue 1:100.

Los anticuerpos y el péptido/proteína recombinante se bloquearon toda la noche a

4°C, antes de agregarlos a las membranas bloqueadas con las diluciones finales de 1:170000 (anticuerpo Full) y 1:50000 (anticuerpo Parcial).

Adicionalmente, se realizaron ensayos de Western Blot utilizando extractos de hoja que habían sido fraccionados a través de una columna de Sephacryl S-300 (Guerrero Garzón, 2012). Se analizaron las fracciones que correspondían a proteínas de masa molecular entre 200 y 150 kDa (fracciones 62 a 68) y fracciones que correspondían a masa moleculares menores de 150 kDa (fracciones 70 a 78).

3.5 Determinación de SnRK2.6 en cortes de tejido de hoja.

Para realizar las inmunolocalizaciones en cortes de tejido, el protocolo fue el siguiente: cortes de tejidos de hojas +Pi y -Pi previamente fijados con parafina (realizados por el laboratorio de Microscopía, USAI Fac. Química), se procedió a desparafinar en una estufa a 60 ºC por 30 min, se quitaron los residuos del paraplast con dos lavados por 10 min con citrisolve (Fisherbrand). Posteriormente, los tejidos se hidrataron con una serie gradual de alcohol etílico (100, 100, 96, 70%) por 3 minutos cada uno, y dos cambios finales de PBS 1X por 10 min cada uno.

Se quitó el exceso de PBS de la laminilla y los cortes se delimitaron con un plumón PAP-PEN para aislarlos entre ellos. Las preparaciones se bloquearon en una cámara húmeda con 100 µL de solución de bloqueo (3% BSA, 0,01% azida de sodio, 0,1% Triton X-100) durante 4 horas a temperatura ambiente.

Los cortes se lavaron con PBS 1X, se agregó el anticuerpo primario (anticuerpo Parcial) a una dilución 1:500 en solución de bloqueo y se incubaron por 12 horas a 4 °C. Las preparaciones se lavaron 3 veces con PBS 1X por 10 min y se colocó el anticuerpo secundario (ALEXA 568 nm, Invitrogen) en solución de bloqueo a una dilución 1:200 durante 4 horas a temperatura ambiente y en oscuridad.

Finalmente, los cortes se lavaron con PBS 1X 4 veces por 10 minutos cada uno, se quitó el exceso de PBS y se colocó el medio de montaje DAKOR (Dako Fluorescent Mounting Medium). Las preparaciones se guardaron en oscuridad a 4 °C hasta su posterior observación en un microscopio confocal OLYMPUS VL1000.

Capítulo 4

Resultados

4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de SnRK2.6

El cDNA que codifica para la proteína SnRK2.6 se amplificó mediante PCR con cebadores específicos que además ayudaron a adicionar sitios de restricción para las enzimas BamHI y *NotI*, que fueron de utilidad para clonaciones posteriores. En la figura 9 se observa el fragmento amplificado de SnRK2.6 que de acuerdo a los marcadores tiene un peso de 1 kpb (1090 pb tamaño teórico)

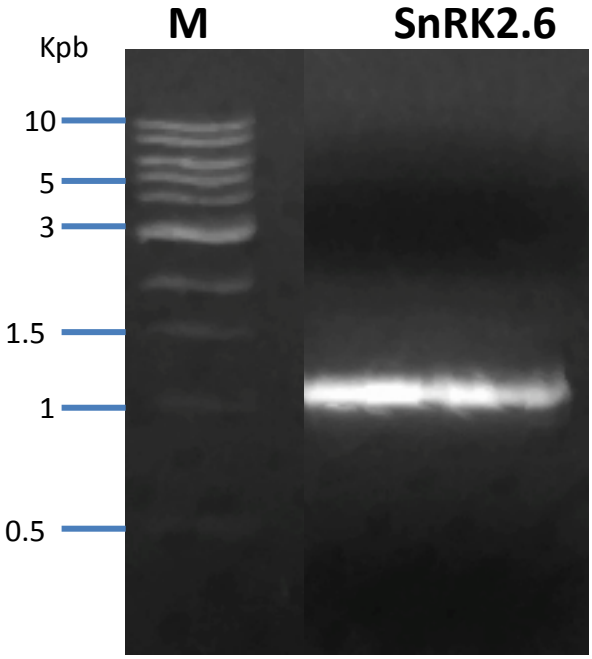


Figura 9: Gel de electroforesis en agarosa, se muestra el PCR de cDNA SnRK2.6 con un tamaño de 1090 pb. M: marcador de peso molecular 1 kb Ladder.

4.2 Inserción del cDNA SnRK2.6 en el vector de clonación pGEM-T easy.

El fragmento de DNA obtenido se insertó al vector pGEM y se aisló el plásmido de algunas bacterias transformantes. Para verificar que el fragmento estuviera integrado al plásmido, se realizó un ensayo de digestión con las enzimas *BamH1* y *Not1*.

En la figura 10 se observan dos bandas, una que corresponde al vector pGEM (3015 pb) y otra al inserto SnRK2.6 (1090 pb).

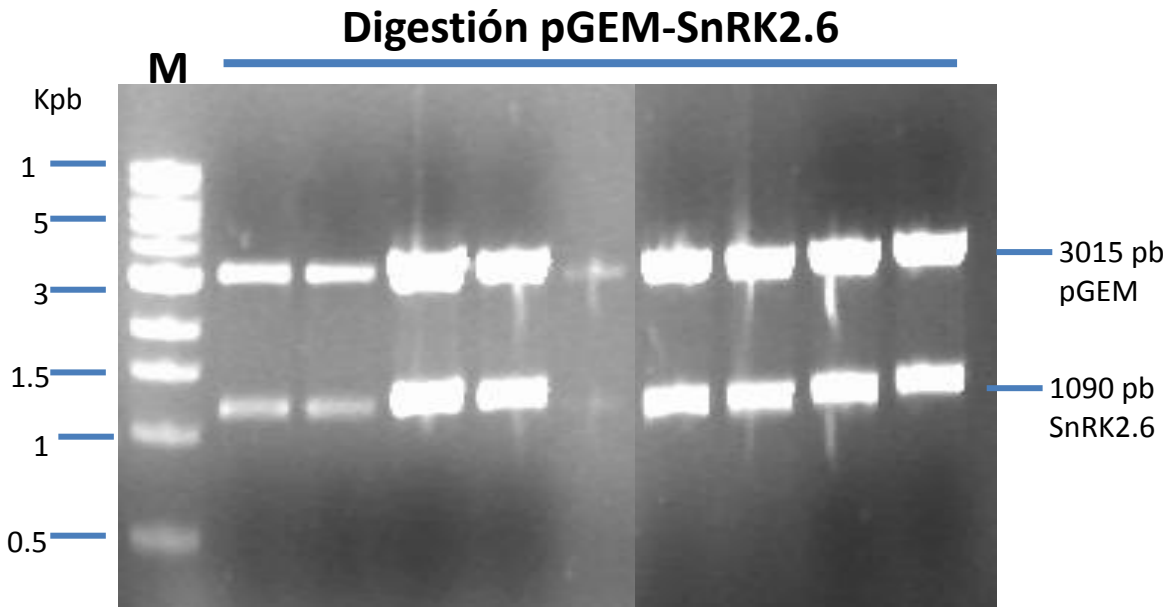


Figura 10: Ensayo de digestión del plásmido pGEM-SnRK2.6 purificado de diferentes colonias. Se observa el vector pGEM en la banda de 3015 pb y el cDNA SnRK2.6 a 1090 pb. M: marcador de peso molecular 1 kb Ladder.

4.3 Inserción de SnRK2.6 en el vector de expresión pGEX 4T-2.

El fragmento de aproximadamente 1090 pb obtenido de la digestión anterior, se purificó y se insertó en el vector pGEX4T2 previamente digerido con las mismas enzimas. Se transformaron células DH5α con la mezcla de inserción y después de purificar el plásmido de algunas colonias seleccionadas, se realizó un ensayo de digestión con las enzimas *BamH1* y *Not1* para verificar la inserción del cDNA en el

vector. La figura 11 muestra el plásmido proveniente de tres colonias con 2 bandas, una que corresponde al vector pGEX4T2 (4970 pb) y otra que corresponde al fragmento de la SnRK2.6 (1090 pb). Una cuarta colonia no presentó ningún inserto y no tenía el plásmido pGEX a pesar de ser resistente al antibiótico.

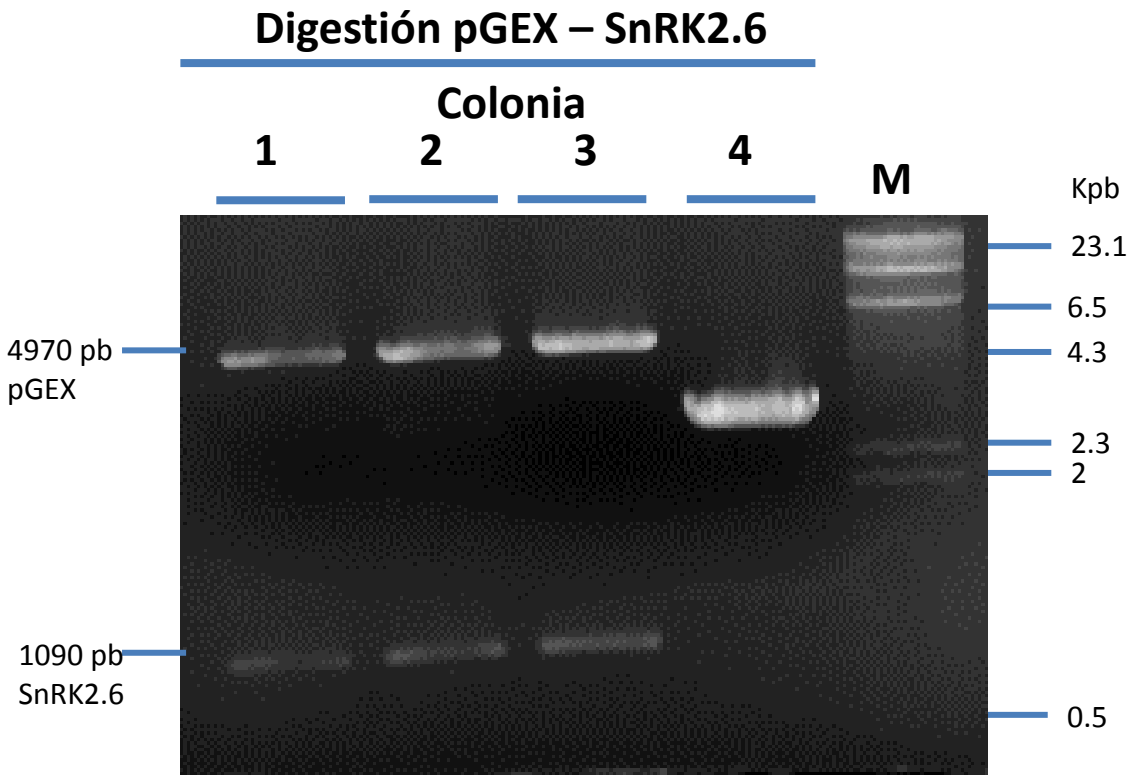


Figura 11: Ensayo de digestión con las enzimas *BamH1* y *Not1* de la construcción pGEX-SnRK2.6. Se observa el vector pGEX a 4970 pb y el cDNA SnRK2.6 a 1090 pb. M: marcador de peso molecular λ/Hind III.

4.4 Expresión y purificación de proteína SnRK2.6

La expresión de la proteína recombinante en las dos condiciones de temperatura (30 °C y 37 °C) y con diferentes concentraciones de IPTG (0.5 mM y 1mM), se analizó en geles de SDS-PAGE. En la figura 12 se observa una mayor cantidad de proteína recombinante en la fracción del sobrenadante con las condiciones de temperatura a 37 °C y con 1 mM de IPTG, la imagen correspondiente a la pastilla se omitió ya que se observa un barrido proteico y no se alcanza a diferenciar proteínas separadas.

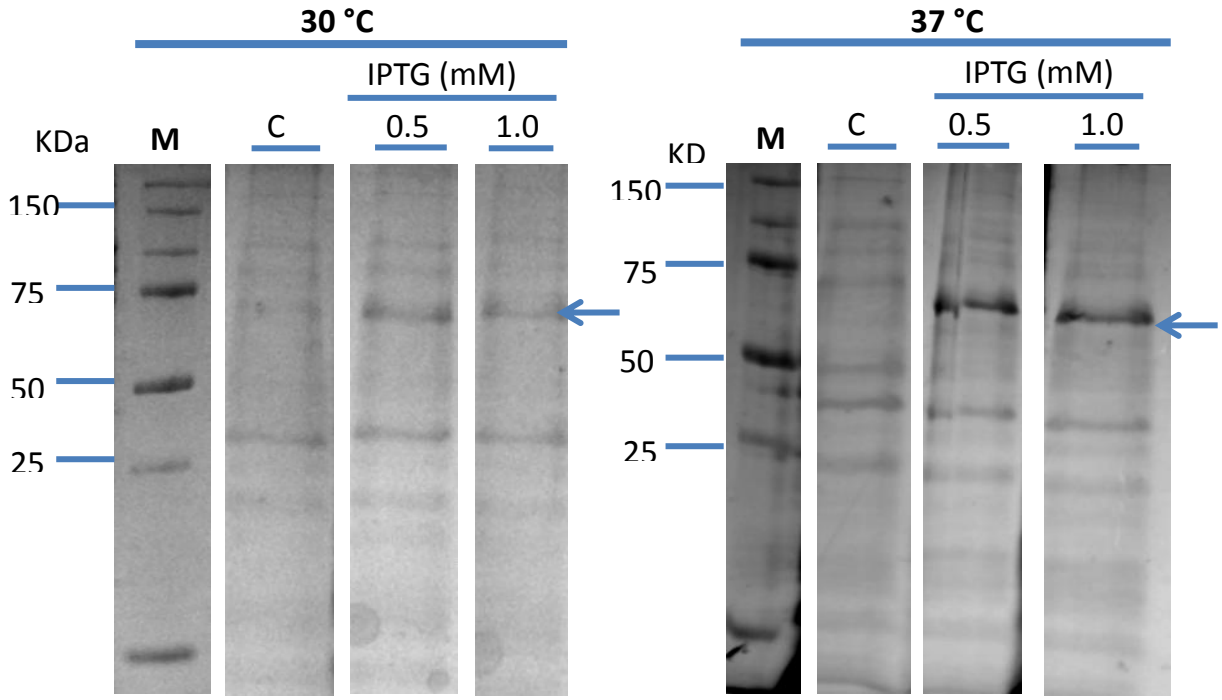


Figura 12: Expresión de proteína recombinante a 30 °C y 37 °C, 0.5 mM y 1mM de IPTG. Sólo se muestra el sobrenadante del extracto proteico, donde se señala con una flecha una banda cercana a 75 kDa que corresponde a la SnRK2.6. C: control; M: marcadores de peso molecular.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para su expresión, se escalaron las condiciones para obtener una mayor cantidad de proteína recombinante. La proteína expresada se purificó por una columna de afinidad (Glutatión-agarosa). La Glutatión S-Transferasa (GST) que está fusionada a la proteína SnRK2.6 es de

Schistosoma japonicum y tiene un peso de 26 kDa, que con el peso teórico de la SnRK2.6 (42 kDa) forman una proteína recombinante de 68 kDa. En la figura 13 se observa un gel SDS-PAGE con las distintas fracciones de todos los pasos de la purificación. En las fracciones eluídas de la columna (1,2 y 3) se observa una banda debajo de los 75 kDa que corresponde a la proteína recombinante. Esta proteína recombinante se utilizó en la obtención de anticuerpos.

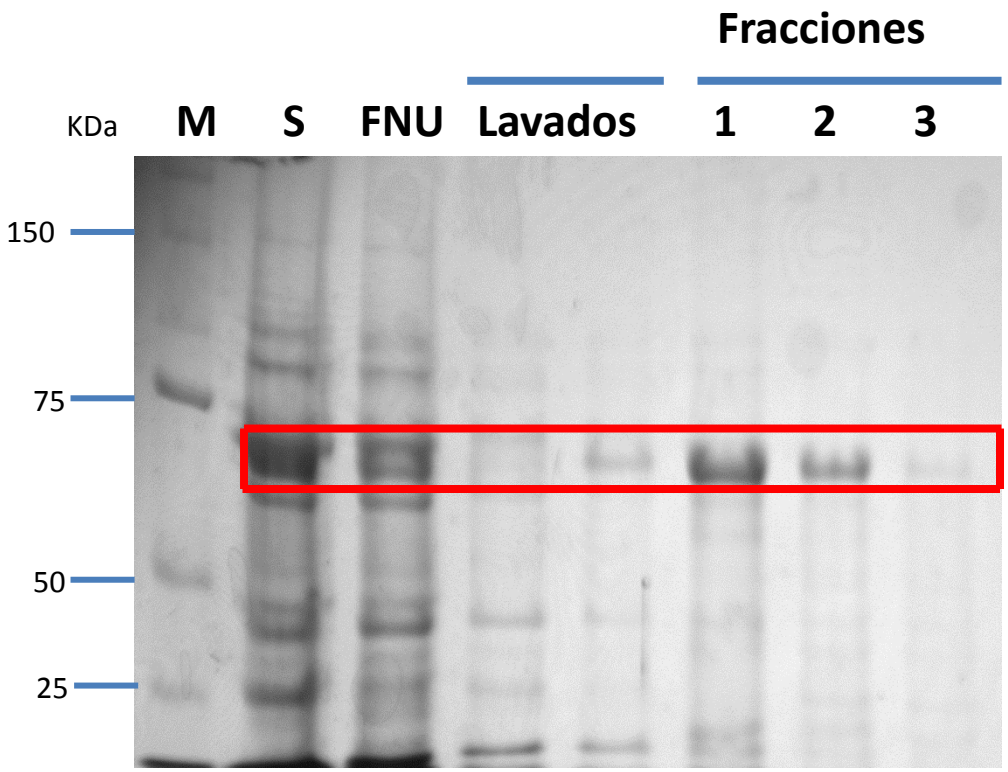


Figura13: Gel SDS-PAGE donde se muestran las diferentes fracciones del proceso de purificación de la proteína recombinante. La SnRK2.6 es la banda cercana a 75 kDa; en la fracción 1 y 2 se observa purificada. S: sobrenadante; FNU: fracción no unida, Fracciones 1, 2, 3, son las fracciones eluidas.

4.5 Obtención de anticuerpos a partir de conejos contra toda la subfamlia SnRK2 y específicamente contra la proteína SnRK2.6

4.5.1 Alineamiento de la subfamilia SnRK2s y síntesis de péptido especifico de la SnRK2.6

El alineamiento del grupo de SnRK2 obtenido con el programa TEXSHADE se encuentra en el anexo 1. A continuación se muestra solo la sección de donde se determinó el péptido a sintetizar.

```
SnRK2.1    AAYYKRDT----SFSLQSVEDIMKIVGEARNPAPSTSAVKSSGSGAD------E---EEE
SnRK2.2    MGSQFQEPEQ----PMQSLDTIMQIISEATIPT------VRNRCLDDFMADNLD--LDDD
SnRK2.3    TGSQFQEPEQ----PMQSLDTIMQIISEATIPA------VRNRCLDDFMTDNLD--LDDD
SnRK2.4    AAYFKKEN---PTFSLQTVEEIMKIVADAKTPPPVSRSIGGFGWGGNGDADGKEEDAEDV
SnRk2.5    AAYYKRET---PSFSLQSVEDIMKIVGEARNPAPSSNAVKGFDDDEEDVEDEVE---EEE
SnRK2.6    MTTQFDESDQ----PGQSIEEIMQIIAEATVPP------AGTQNLNHYLTGSLD--IDDD
SnRK2.7    CDNGVEEEEEEEEKCRQSVEEIVKIIEEARKGVN---GTDNNGGLG-LIDGSID--LDDI
SnRK2.8    MMNGP---------STQTVEEIVWIIEEARKPITVATGLAGAGGSGGSSNGAIG--SSSM
SnRK2.9    AIYYQRNVNL-INFSPQRVEEIMKIVGEARTIPNLSRPVESLG--------------SDK
SnRK2.10   AAYFRKEN---PTFSLQSVEEIMKIVEEAKTPARVSRSIGAFGWGGGEDAEGKE---EDA
consensus  aayy-re------fslQsveeImkIvgeAr-p---t--v-g-g--a--m-d-le---ede
```

Figura 14: Fragmento del alineamiento de la subfamilia SnRK2: SnRK2.1 a SnRK2.10. La flecha naranja indica la secuencia del péptido específico SnRK2.6: QNLHYLTG.

El péptido sintetizado por “Genescript” fue de 9 aminoácidos: QNLNHYLTG unido a hemaglutinina. Esta secuencia se observa en el alineamiento a partir del aminoácido 343, en la región del carboxilo terminal.

4.5.2 Validación de anticuerpos.

El péptido sintetizado y la proteína recombinante se inyectaron a conejos para obtener anticuerpos tanto para toda la subfamilia de SnRK2´s como en específico para la SnRK2.6, como se describe en el capítulo de metodología. Al terminar con la inmunización y obtención de los anticuerpos, se procedió a analizar el reconocimiento de los anticuerpos mediante Western Blot. Para realizar este análisis se utilizó la proteína recombinante GST-SnRK2.6 (68 kDa). En la figura 15

se observa que tanto, los anticuerpos obtenidos contra la proteína completa, como los que se obtuvieron con el péptido específico, reconocen a la proteína recombinante. En el caso del conejo 1, otras señales pequeñas aparecen en la membrana.

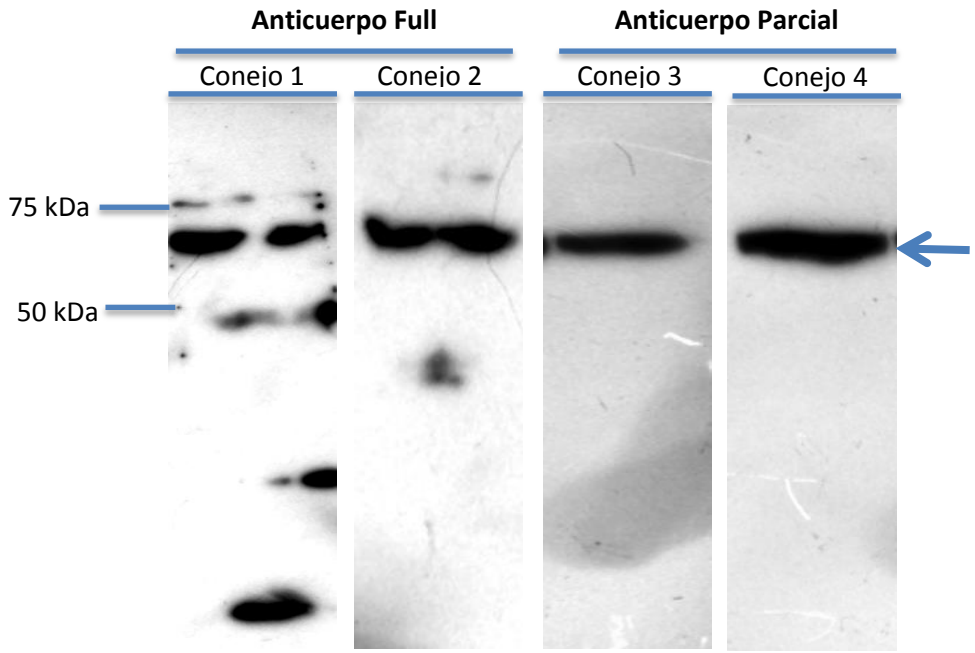


Figura 15: Validación de anticuerpos Full y Parcial con la proteína recombinante SnRK2.6. Ambos anticuerpos reconocen a la proteína recombinante SnRK2.6, banda de 68 kDa indicada con la flecha.

4.6 Determinación de SnRK2.6 en extracto de tejido de hoja y raíz de *Arabidopsis thaliana.*

Una vez validado los anticuerpos, se procedió a identificar a la SnRK2.6 en extractos de hoja y raíz en condiciones de deficiencia y suficiencia de fósforo. Resultados acumulados en la base de datos “Genevestigator” muestran que en las primeras semanas de desarrollo de la planta existe una mayor expresión del gen *SnRK2.6* (figura 16-A), que a nivel anatómico, es en las hojas donde se expresa en mayor cantidad (figura 16-B).

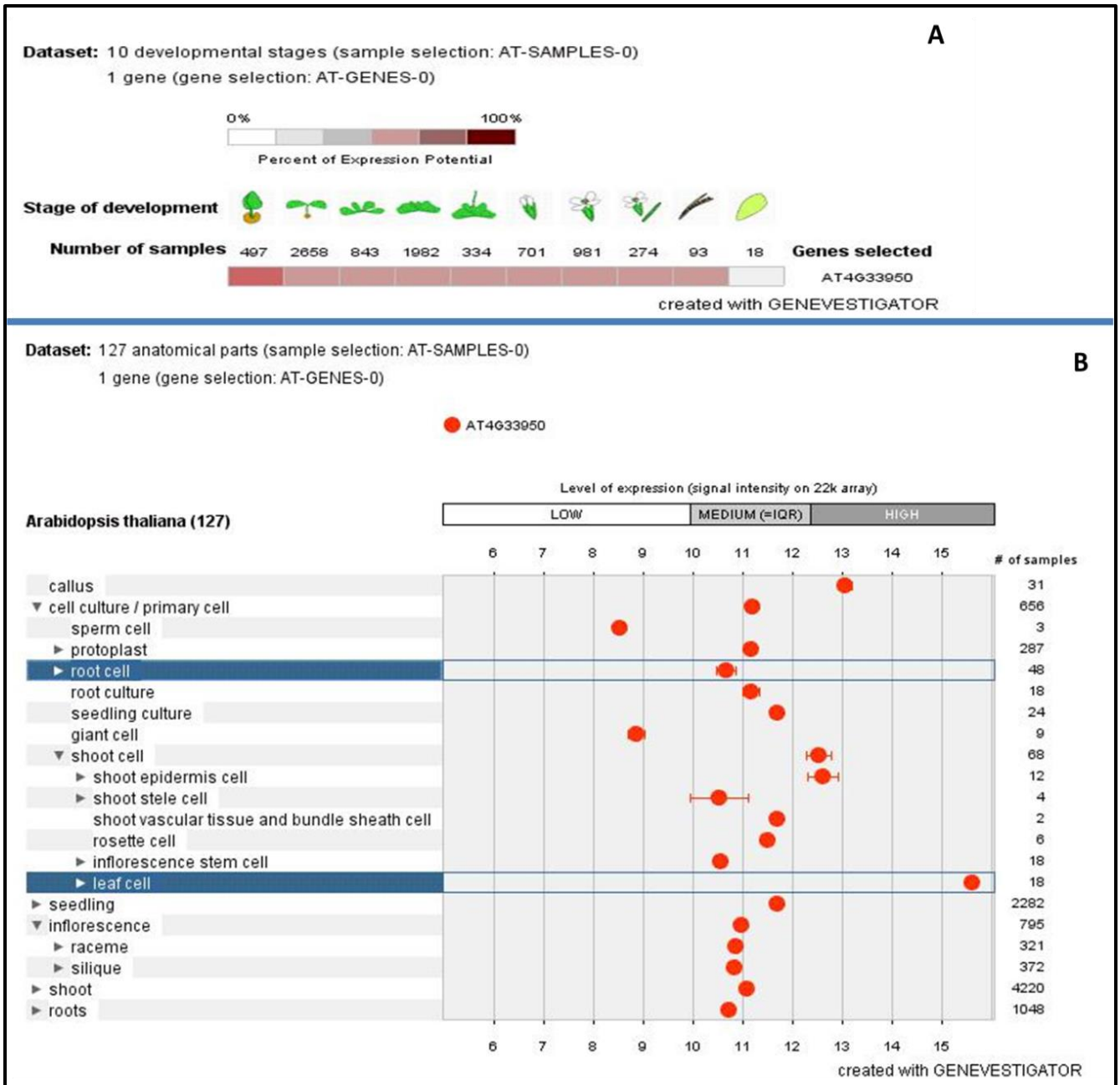
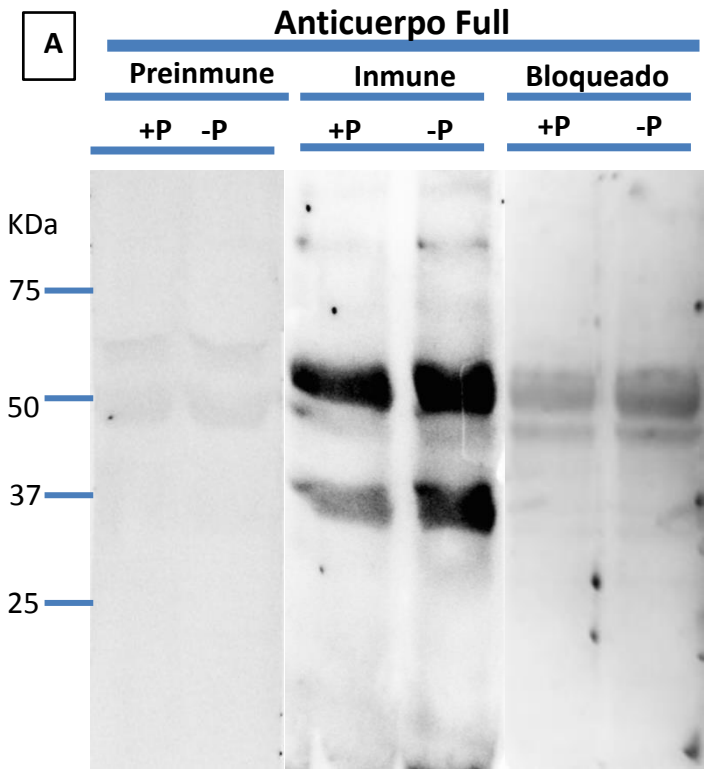
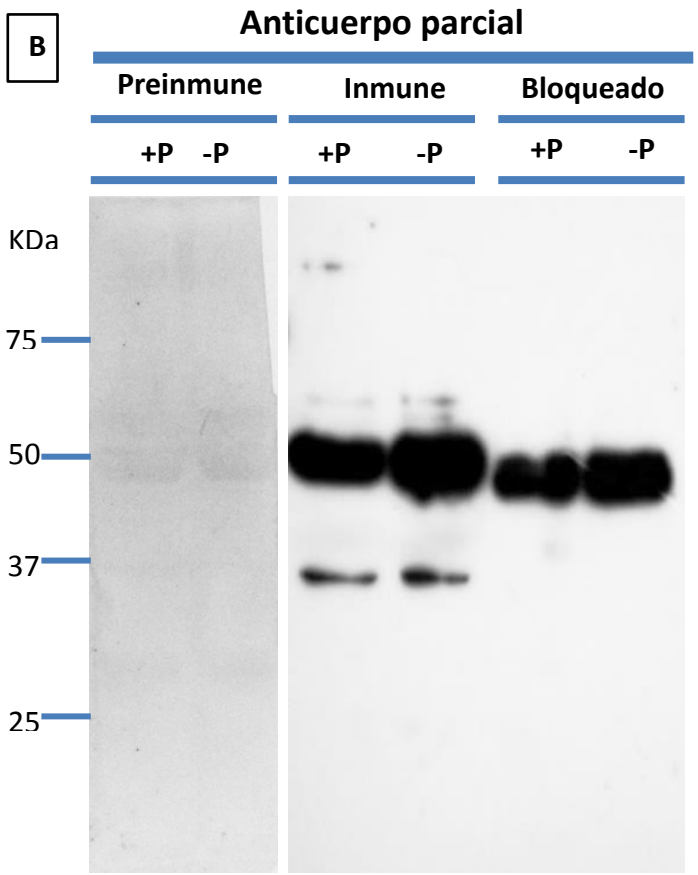


Figura 16: Expresión del gen *SnRK2.6*.
(A) Expresión del gen a lo largo de las fases fenológicas, se alcanza mayor expresión en la fase de germinación. **(B)** Expresión del gen en partes anatómicas, en azul se presenta la expresión en raíz y hojas.

A nivel proteína, con ensayos tipo Western blot realizados en el laboratorio en raíz en deficiencia y suficiencia de fósforo, no se identificó ninguna proteína con los anticuerpos, aún cuando se aumentaran las cantidades de proteína y/o anticuerpo. Estos datos indican que la cinasa SnRK2.6 no se expresa en raíces. Por el contrario, el análisis de hoja identificó una banda cercana a 37 kDa tanto con el

anticuerpo total como con el parcial (Figura 17 A y B). Existe, sin embargo, una detección no específica de la Rubisco (50 kDa), que en hoja es una proteína muy abundante. Para determinar si la proteína de 37 kDa corresponde a la SnRK2.6, se realizaron ensayos de bloqueo, en donde los anticuerpos bloqueados con sus respectivos antígenos, eran utilizados en los Western blots. La Figura 17 muestra que la señal de la proteína de 37 kDa desaparece con ambos anticuerpos bloqueados, mientras que la de 50 kDa continúa presente. Estos resultados sugieren que esta última es una proteína reconocida inespecíficamente, mientras que la de 37 kDa es específica de los anticuerpos. Adicionalmente con ambos anticuerpos, se observa que existe un ligero aumento en la cantidad de la proteína que proviene del tratamiento con deficiencia de fósforo. Interesantemente, este aumento parece ser mayor con el anticuerpo contra la proteína completa que con el parcial, lo que indicaría que otras cinasas de la familia SnRK2 podrían estar aumentando su cantidad en estas condiciones de crecimiento. En ambos casos, el anticuerpo preinmune no reconoce ninguna proteína. Un gel teñido con azul de Coomassie se muestra en la figura 17-C, indicando que se cargó en los geles a la misma cantidad de proteína.





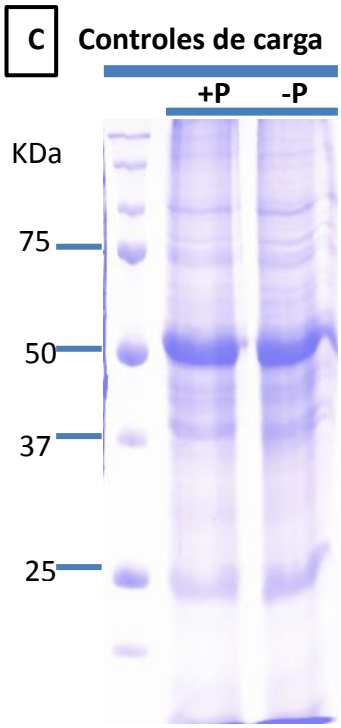


Figura 17: Identificación de SnRK2.6 en extractos de hoja creciendo en presencia de (+Pi) o deficiencia (–Pi) de fosfato.
(A) Identificación con el anticuerpo Full a la dilución 1:170000.
(B) Identificación con el anticuerpo Parcial dilución 1:50000.
(C) Control de carga con 30 µg de proteína, teñido con azul de Coomassie.
Los Western Blot se incubaron con suero preinmune, inmune o con el suero bloqueado con el péptido con el que se llevó a cabo la inmunización.

Adicionalmente, se analizaron fracciones obtenidas de la separación de un extracto proteico de hojas de plantas creciendo en suficiencia (+Pi) o deficiencia (-Pi) de fósforo, a través de una columna de exclusión molecular (ver Antecedentes inmediatos, Figura 8). Estas fracciones habían sido analizadas para detectar proteínas de la familia de cinasas SnRK1 y se había determinado que el complejo proteico se encontraba entre las fracciones del pico de mayor actividad, que correspondían a las fracciones 62 a 68, con una masa molecular aproximada de 150-200 kDa. Por otro lado, un segundo pico de actividad se encontraba entre las fracciones 70 a 78 que contenían proteínas de masa molecular menor a 150 kDa, en la cuales se sugería que se encontraban las SnRK2 (Guerrero, 2011; Coello *et al.,* 2012). En el caso de la identificación de SnRK2.6 en estas fracciones (62 a 78), los resultados indicaron que la proteína se encuentra en las fracciones de alto peso molecular (PM 250-150 kDa), tanto en los extractos de hoja +Pi como en los de –Pi (Figura 18). Estos resultados sugieren que la cinasa SnRK2.6 podría estar formando complejos con otras proteínas, lo que provoca que eluya en fracciones de masas moleculares más altas.

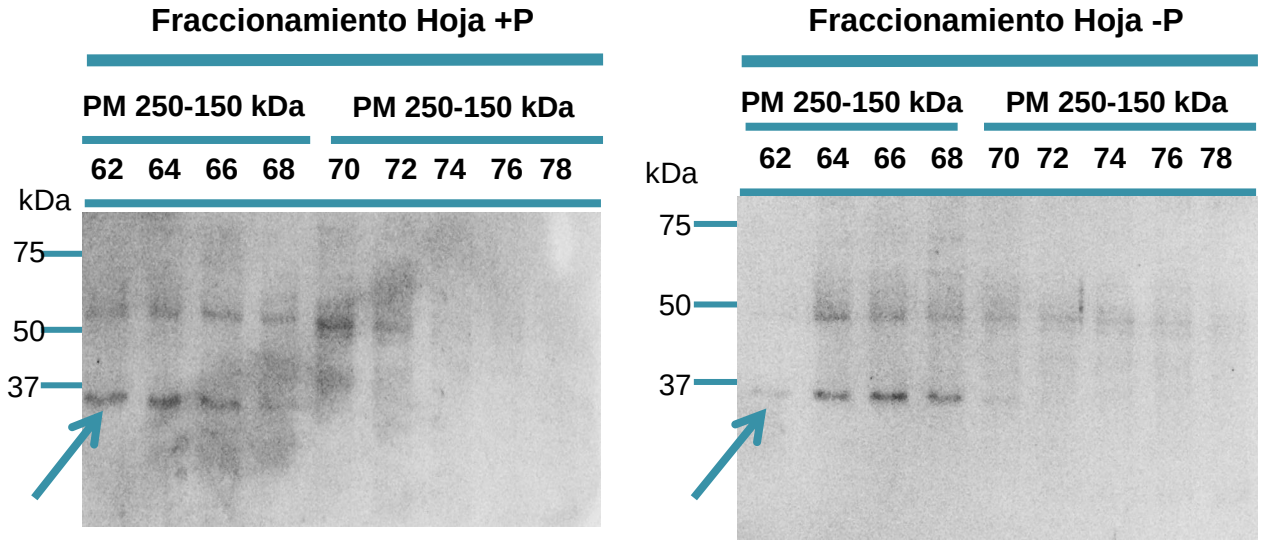


Figura 18: Identificación de SnRK2.6 en fracciones de extracto proteico de hoja de plantas creciendo en suficiencia (+Pi) y deficiencia (–Pi) de fósforo purificadas por exclusión molecular. La flecha indica la proteína SnRK2.6, la cual se identificó en las fracciones de peso molecular de 250 a 150 kDa. El Western Blot se realizó con el anticuerpo parcial.

4.7 Determinación de SnRK2.6 en cortes de tejido de hoja.

Para determinar si existía un cambio en la localización de la proteína en función de la condición nutrimental, se realizaron inmunodetecciones en cortes histológicos de hojas de Arabidopsis en condiciones +Pi y –Pi. La figura 19 muestra tres paneles para los cortes de hojas +Pi y –Pi. El panel marcado como “SnRK2.6” representa el fluorocromo Alexa 568 asociado al anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo SnRK2.6 parcial, el de “cloroplastos” representa la autoflorescencia encontrada en los cloroplastos y el sobrelape, son las dos imágenes sobrepuestas para determinar la localización cloroplástica ó citoplásmica. Los resultados indican, que no existe un aparente cambio en la localización subcelular de la proteína en función de la condición energética, sin embargo, la identificación de organelos como núcleo ó mitocondria no se realizó por lo que no se puede descartar movimiento de la proteína hacia esos compartimentos.

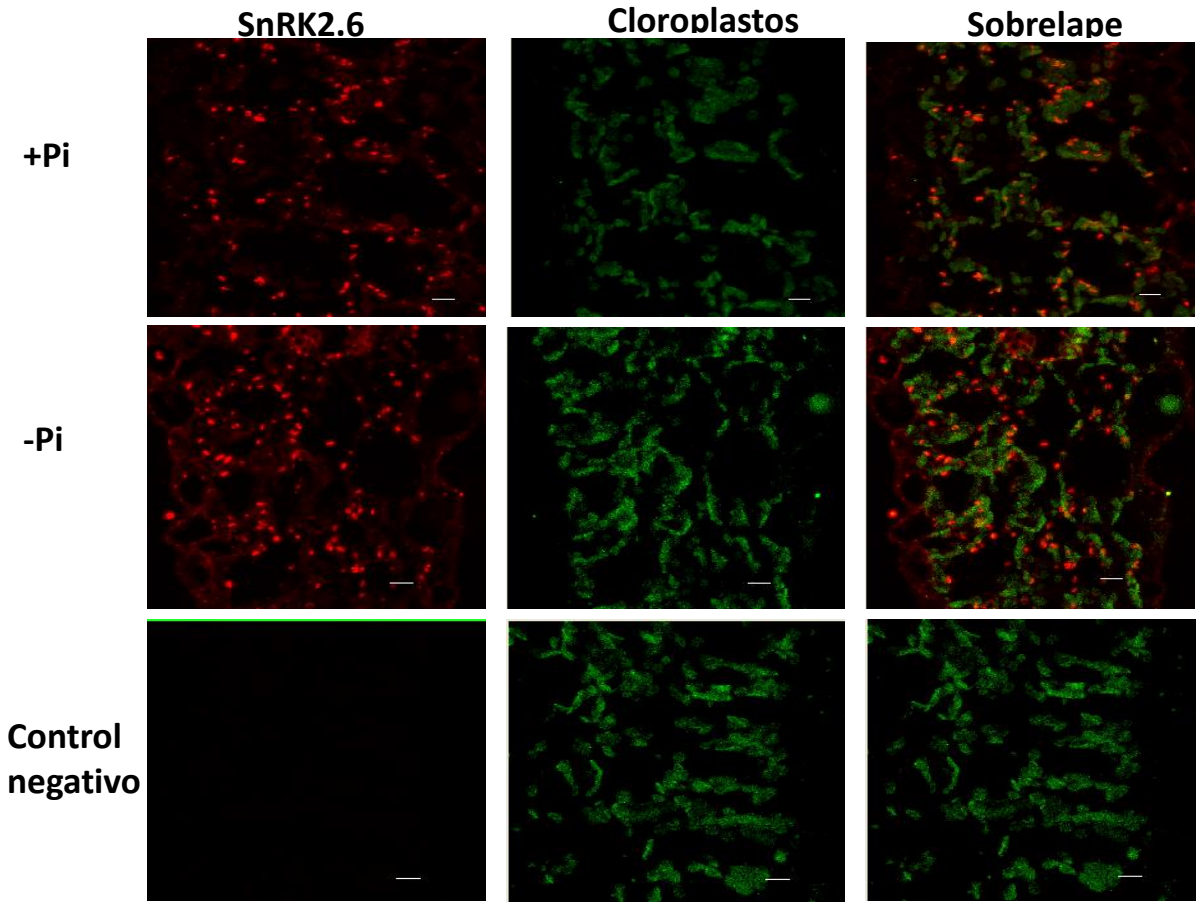


Figura 19: Localización de la proteína SnRK2.6 por medio de inmunohistoquímicas. Imágenes de fluorescencia obtenidas de un microscopio confocal utilizando anticuerpos contra SnRK2.6. Los tejidos utilizados fueron cortes de hojas de plantas crecidas en condiciones de suficiencia (+Pi) y deficiencia (–Pi) de fósforo. La señal de SnRK2.6 está en color rojo (fluorocromo Alexa 568) y los cloroplastos en verde (clorofila). La inmunodetección se realizó con el anticuerpo parcial, dilución 1:500. El control negativo se realizó sin anticuerpo primario. Barra: 1 mm.

CAPÍTULO 5
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La proteína cinasa SnRK2.6 tiene una importancia relevante en la adaptación metabólica y fisiológica de las plantas en condiciones de estrés abiótico como osmolaridad y sequía; sin embargo, su función en la adaptación a deficiencia energética producida por inanición nutricional como la deficiencia de fósforo es aún desconocida.

Resultados obtenidos a partir de diversas bases de datos (Genevestigator, Zimmerman, 2004) mostraron que la expresión del gen *SnRK2.6* es mayor en plántulas crecidas en condiciones normales, mientras que a nivel de órgano, las hojas presentan una mayor expresión que en raíz, silicua y semilla (Figura 16). Este mismo patrón de expresión se conserva cuando las plantas son sometidas a diversos tipos de estreses nutrimentales (Coello *et al.* 2011), y en particular, la deficiencia de fósforo aumenta la expresión del gen *SnRK2.6* en hojas pero no en la raíz de Arabidopsis (Figura 7). Los resultados obtenidos en este estudio a nivel de proteína (Figura 17), concuerdan en términos generales con este patrón de expresión: SnRK2.6 se encuentra presente en hojas pero no en raíces y la cantidad aumenta ligeramente en plántulas sometidas a deficiencia nutrimental. El hecho de que el aumento en la cantidad de proteína durante el crecimiento en deficiencia de fósforo no corresponda completamente al aumento que se observa a nivel de transcrito, sugiere que existe otro nivel de regulación además del transcripcional.

Umezawa *et al.* (2010), describe detalladamente la función de la cinasa SnRK2.6 principalmente en dos compartimientos: núcleo y citoplasma. En el núcleo se relaciona con la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de genes que responden a la hormona ABA, y se ha demostrado que SnRK2.6 colocaliza con factores de transcripción que responden a ABA en este organelo (Fujita et al., 2009). En el citoplasma fosforilan a receptores iónicos involucrados en el cierre de estomas. Los resultados obtenidos de las inmunolocalizaciones utilizando anticuerpos específicos para la proteína (Figura 19), indican una

localización citoplásmica. No obstante, la falta de marcadores específicos de organelos, en particular de núcleo, no nos permitió distinguir su presencia en ese organelo. Sin embargo, sí se observó un aumento significativo en la cantidad de la proteína a nivel celular, lo que también se puede apreciar en los ensayos Western blot. Estos datos sugieren que la diferencia entre las dos condiciones nutrimentales puede afectar la cantidad de la SnRK2. Un factor adicional, que puede regular la actividad de la cinasa es su autofosforilación. Datos obtenidos de la literatura indican que la cinasa se autofosforila de forma constitutiva pero también una fosfatasa tipo PP2C la inactiva continuamente. Es solamente cuando existe presencia de ABA, que se inactiva a la fosfatasa y la cinasa puede conservarse en un estado activo. Se ha observado en tres diferentes variedades de espárrago que crecieron en deficiencia de fósforo, que el nivel de ABA se incrementó de manera diferencial en raíces y hojas, en relación a su estado de desarrollo (Liu *et al.*, 2004). Además, el papel de ABA en la respuesta a la deficiencia de fósforo, se ha sugerido después de analizar el patrón de crecimiento de las plantas en estrés. Por ejemplo, una de las características más claras de la deficiencia de fósforo, es la inhibición del crecimiento de las plantas, en particular la parte aérea. Este tipo de inhibición selectiva, es también observada en plantas que han sido sometidas a estrés hídrico y en plantas asperjadas con ABA. La similaridad en los patrones de crecimiento entre las plantas con estrés hídrico y las plantas que crecen en deficiencia de fósforo, sugieren que el ABA juega un papel importante en la regulación del crecimiento en plantas que crecen en condiciones de deficiencia de fósforo (Trull et al., 1997). En este sentido se puede sugerir que la deficiencia de fósforo incrementaría los niveles de ABA y bajo esas condiciones las cinasas tipo SnRK2 se encontrarían activas. Para comprobar esta hipótesis, deberán de realizarse ensayos específicos para medir la actividad de estas cinasas en condiciones de deficiencia nutrimental.

Un dato interesante, es que de las tres proteínas cinasas tipo SnRK2 involucradas en respuesta a ABA, el transcrito para la SnRK2.2 disminuye durante estrés por deficiencia de fósforo (Figura 7), sugiriendo que podría existir un papel diferencial

de estas cinasas en respuesta a estrés nutrimental. Este dato deberá de corroborarse a nivel de proteína.

El fraccionamiento de un extracto proteico de hojas de *Arabidopsis thaliana* a través de una columna de exclusión molecular ha demostrado una separación muy clara entre los complejos de las cinasas SnRK1 y el de las SnRK2 (Coello et al., 2012). En el presente trabajo, se logró identificar a la SnRK2.6 en las fracciones de más alto peso molecular, 200 – 150 kDa, que estarían en un tamaño equivalente al complejo SnRK1 (Figura 18). Estos resultados sugieren que estas cinasas podrían asociarse con otras proteínas que modifican su movimiento a través de esa columna de exclusión molecular. Podríamos sugerir que la asociación con esas proteínas es muy importante para su regulación por lo que su identificación daría algún indicio del mecanismo de regulación de SnRK2.6.

5.1 CONCLUSIONES

- Se expresó la SnRK2.6 como proteína recombinante asociada a GST.
- Se obtuvieron anticuerpos contra la proteína completa y contra un epítope específico y ambos reconocen de una manera eficiente a la proteína recombinante.
- Se identificó a la proteína en un extracto de hojas de Arabidopsis pero no se observó ninguna señal en la raíz.
- Se observó un aumento en la cantidad de proteína SnRK2.6 en tejido de hojas en condiciones de deficiencia de fósforo.
- No hay un cambio significativo en la localización subcelular entra las dos condiciones de fósforo, +Pi y –Pi.
- Probablemente, la SnRK2.6 se asocia a otras proteínas formando complejos de alto peso molecular.

5.2 PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos con mutantes *snrk*2.2 / *snrk*2.3 / *snrk*2.6 en condiciones de deficiencia de fósforo y diferentes condiciones de ABA.
- Realizar inmunolocalizaciones utilizando marcadores de organelos para identificar regiones específicas en el citoplasma.

6. Bibliografía

Antoni, R., Gonzalez-Guzman, M., Rodriguez, L., Rodrigues, A., Pizzio, G. A., & Rodriguez, P. L. (2012). Selective inhibition of clade A phosphatases type 2C by PYR/PYL/RCAR abscisic acid receptors. Plant Physiol, 158(2), 970-980.

Ben-Ari, G. (2012). The ABA signal transduction mechanism in commercial crops: learning from *Arabidopsis*. [Review]. Plant Cell Rep, 31(8), 1357-1369.

Coello, P., Hey, S. J., & Halford, N. G. (2011). The sucrose non-fermenting-1-related (SnRK) family of protein kinases: potential for manipulation to improve stress tolerance and increase yield. J Exp Bot, 62(3), 883-893.

Coello, P., Hirano, E., Hey, S. J., Muttucumaru, N., Martinez-Barajas, E., Parry, M. A., & Halford, N. G. (2012). Evidence that abscisic acid promotes degradation of SNF1-related protein kinase (SnRK) 1 in wheat and activation of a putative calcium-dependent SnRK2. J Exp Bot, 63(2), 913-924.

Chiou, T. J., & Lin, S. I. (2011). Signaling network in sensing phosphate availability in plants. Annu Rev Plant Biol, 62, 185-206.

Fragoso, S., Espindola, L., Paez-Valencia, J., Gamboa, A., Camacho, Y., Martinez-Barajas, E., & Coello, P. (2009). SnRK1 isoforms AKIN10 and AKIN11 are differentially regulated in *Arabidopsis* plants under phosphate starvation. Plant Physiol, 149(4), 1906-1916.

Fujita, Y., Nakashima, K., Yoshida, T., Katagiri, T., Kidokoro, S., Kanamori, N., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three SnRK2 protein kinases are the main positive regulators of abscisic acid signaling in response to water stress in *Arabidopsis*. Plant Cell Physiol, 50(12), 2123-2132.

Guerrero, J. (2012). Identificación de complejos formados por la SnRK1 durante la deficiencia en fósforo en *Arabidopsis thaliana*. Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Hu, B., & Chu, C. (2011). Phosphate starvation signaling in rice. Plant Signal Behav, 6(7), 927-929.

Klingler, J. P., Batelli, G., & Zhu, J. K. (2010). ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. [Review]. J Exp Bot, 61(12), 3199-3210.

Kobayashi, Y., Murata, M., Minami, H., Yamamoto, S., Kagaya, Y., Hobo, T., Hattori, T. (2005). Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. Plant J, 44(6), 939-949.

Kulik, A., Wawer, I., Krzywinska, E., Bucholc, M., & Dobrowolska, G. (2011). SnRK2 protein kinases--key regulators of plant response to abiotic stresses. OMICS, 15(12), 859-872.

Lee, S. C., & Luan, S. (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. Plant Cell Environ, 35(1), 53-60.

Leung, J. (2012). Plant science. Controlling hormone action by subversion and deception. Science, 335(6064), 46-47.

Liu Hou-cheng;KUANG Yan-hua;CHEN Ri-yuan. Effect of phosphorus-deficiency stress on abscisic acid contents in asparagus bean seedlings[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2004, 10(6): 629-.

Mizoguchi, M., Umezawa, T., Nakashima, K., Kidokoro, S., Takasaki, H., Fujita, Y. Shinozaki, K. (2010). Two closely related subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression. Plant Cell Physiol, 51(5), 842-847.

Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S. Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy. Plant Cell Physiol, 50(7), 1345-1363.

Ng, L. M., Soon, F. F., Zhou, X. E., West, G. M., Kovach, A., Suino-Powell, K. M. Xu, H. E. (2011). Structural basis for basal activity and autoactivation of abscisic acid (ABA) signaling SnRK2 kinases. Proc Natl Acad Sci U S A, 108(52), 21259-21264.

Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S. Y., Wang, A., Carvalho, P. C. Schroeder, J. I. (2010). PYR/PYL/RCAR family members are major in-vivo ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in *Arabidopsis*. Plant J, 61(2), 290-299.

Niu, Y. F., Chai, R. S., Jin, G. L., Wang, H., Tang, C. X., & Zhang, Y. S. (2013). Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. Ann Bot, 112(2), 391-408.

Panigrahy, M., Rao, D. N., & Sarla, N. (2009). Molecular mechanisms in response to phosphate starvation in rice. Biotechnol Adv, 27(4), 389-397.

Poirier, Y., & Bucher, M. (2002). Phosphate transport and homeostasis in Arabidopsis. Arabidopsis Book, 1, e0024.

Plaxton, W. C., & Tran, H. T. (2011). Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. Plant Physiol, 156(3), 1006-1015.

Radin, J. W. (1984). Stomatal responses to water stress and to abscisic Acid in phosphorus-deficient cotton plants. Plant Physiol, 76(2), 392-394.

Rouached, H. (2011). Multilevel coordination of phosphate and sulfate homeostasis in plants. [Review]. Plant Signal Behav, 6(7), 952-955.

Rouached, H., Arpat, A. B., & Poirier, Y. (2010). Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and cross-talks. Mol Plant, 3(2), 288-299.

Rouached, H., Stefanovic, A., Secco, D., Bulak Arpat, A., Gout, E., Bligny, R., & Poirier, Y. (2011). Uncoupling phosphate deficiency from its major effects on growth and transcriptome via PHO1 expression in *Arabidopsis*. Plant J, 65(4), 557-570.

Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A. C., 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(16), 2122-2133.

Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., . . . Uozumi, N. (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. Biochem J, 424(3), 439-448.

Soon, F. F., Ng, L. M., Zhou, X. E., West, G. M., Kovach, A., Tan, M. H., . . . Xu, H. E. (2012). Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. Science, 335(6064), 85-88.

Sun, H. L., Wang, X. J., Ding, W. H., Zhu, S. Y., Zhao, R., Zhang, Y. X., . . . Zhang, D. P. (2011). Identification of an important site for function of the type 2C protein phosphatase ABI2 in abscisic acid signalling in *Arabidopsis*. J Exp Bot, 62(15), 5713-5725.

Trull, M. C., Guiltinan, M.J., Lynch, J.P., and Deikman, J. . (1997). The responses of wilde-type and ABA mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus starvation. Plant, Cell & Environ., 20, 85–92.

Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. Plant Cell Physiol, 51(11), 1821-1839.

Xie, T., Ren, R., Zhang, Y. Y., Pang, Y., Yan, C., Gong, X., . . . Yan, N. (2012). Molecular mechanism for inhibition of a critical component in the *Arabidopsis thaliana* abscisic acid signal transduction pathways, SnRK2.6, by protein phosphatase ABI1. J Biol Chem, 287(1), 794-802.

Yoshida, R., Umezawa, T., Mizoguchi, T., Takahashi, S., Takahashi, F., & Shinozaki, K. (2006). The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. J Biol Chem, 281(8), 5310-5318.

Yuan, H., & Liu, D. (2008). Signaling components involved in plant responses to phosphate starvation. [Review]. J Integr Plant Biol, 50(7), 849-859.

Yunta, C., Martinez-Ripoll, M., & Albert, A. (2011). SnRK2.6/OST1 from *Arabidopsis thaliana:* cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of K50N and D160A mutants. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 67(Pt 3), 364-368.

Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., & Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. Plant Physiol, 136(1), 2621-2632.

Anexo 1: Alineamiento de la subfamilia SnRK2

```
SnRK2.1    --------------------MDKYDVVKDLGAGNFGVARLLRHKDTKELVAMKYIERGRKI
SnRK2.2    MDPATNSPIMPIDLPIMHDSDRYDFVKDIGSGNFGVARLMTDRVTKELVAVKYIERGEKI
SnRK2.3    MDRAP-VTTGPLDMPIMHDSDRYDFVKDIGSGNFGVARLMRDKLTKELVAVKYIERGDKI
SnRK2.4    --------------------MDKYELVKDIGAGNFGVARLMKVKNSKELVAMKYIERGPKI
SnRk2.5    --------------------MDKYEVVKDLGAGNFGVARLLRHKETKELVAMKYIERGRKI
SnRK2.6    MDRP--AVSGPMDLPIMHDSDRYELVKDIGSGNFGVARLMRDKQSNELVAVKYIERGEKI
SnRK2.7    --------------------MERYDILRDLGSGNFGVAKLVREKANGEFYAVKYIERGLKI
SnRK2.8    --------------------MERYEIVKDIGSGNFGVAKLVRDKFSKELFAVKFIERGQKI
SnRK2.9    --------------------MEKYEMVKDLGFGNFGLARLMRNKQTNELVAVKFIDRGYKI
SnRK2.10   --------------------MDKYELVKDIGAGNFGVARLMRVKNSKELVAMKYIERGPKI
consensus  --------------------mdkYevvkDiGsGNFGvArLmrdk-tkElvAvKyIeRG-KI

SnRK2.1    DENVAREIINHRSLKHPNIIRFKEVILTPTHLAIVMEYASGGELFDRICTAGRFSEAE--
SnRK2.2    DENVQREIINHRSLRHPNIVRFKEVILTPSHLAIVMEYAAGGELYERICNAGRFSEDE--
SnRK2.3    DENVQREIINHRSLRHPNIVRFKEVILTPTHLAIIMEYASGGELYERICNAGRFSEDE--
SnRK2.4    DENVAREIINHRSLRHPNIIRFKEVVLTPTHLAIAMEYAAGGELFERICSAGRFSEDEEE
SnRk2.5    DENVAREIINHRSLRHPNIIRFKEVILTPTHLAIVMEYASGGELFERICNAGRFSEAE--
SnRK2.6    DENVKREIINHRSLRHPNIVRFKEVILTPTHLAIVMEYASGGELFERICNAGRFSEDE--
SnRK2.7    DEHVQREIINHRDLKHPNIIRFKEVFVTPTHLAIVMEYAAGGELFERICNAGRFSEDE--
SnRK2.8    DEHVQREIMNHRSLIHPNIIRFKEVLLTATHLALVMEYAAGGELFGRICSAGRFSEDE--
SnRK2.9    DENVAREIINHRALNHPNIVRFKEVVLTPTHLGIVMEYAAGGELFERISSVGRFSEAE--
SnRK2.10   DENVAREIINHRSLRHPNIIRFKEVVLTPTHIAIAMEYAAGGELFERICSAGRFSEDE--
consensus  DEnVaREIiNHRsLrHPNIiRFKEVilTptHlaivMEYAaGGELfeRIcnaGRFSEdE--

SnRK2.1    ------ARYFFQQLICGVDYCHSLQICHRDLKLENTLLDGSPAPLLKICDFGYSKSSILH
SnRK2.2    ------ARFFFQQLISGVSYCHAMQICHRDLKLENTLLDGSPAPRLKICDFGYSKSSVLH
SnRK2.3    ------ARFFFQQLLSGVSYCHSMQICHRDLKLENTLLDGSPAPRLKICDFGYSKSSVLH
SnRK2.4    GNKRKHARYFFQQLISGVSYCHAMQICHRDLKLENTLLDGSPAPRLKICDFGYSKSSLLH
SnRk2.5    ------ARYFFQQLICGVDYCHSLQICHRDLKLENTLLDGSPAPLLKICDFGYSKSSLLH
SnRK2.6    ------ARFFFQQLISGVSYCHAMQVCHRDLKLENTLLDGSPAPRLKICDFGYSKSSVLH
SnRK2.7    ------GRYYFKQLISGVSYCHAMQICHRDLKLENTLLDGSPSSHLKICDFGYSKSSVLH
SnRK2.8    ------ARFFFQQLISGVNYCHSLQICHRDLKLENTLLDGSEAPRVKICDFGYSKSGVLH
SnRK2.9    ------ARYFFQQLICGVHYLHALQICHRDLKLENTLLDGSPAPRLKICDFGYSKSSVLH
SnRK2.10   ------ARYFFQQLISGVSYCHAMQICHRDLKLENTLLDGSPAPRLKICDFGYSKSSLLH
consensus  ------aRyfFqQLisGVsYcHamQiCHRDLKLENTLLDGSpaprlKICDFGYSKSsvLH

SnRK2.1    SRPKSTVGTPAYIAPEVLSRREYDGKHADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDPNDPKNFRKTI
SnRK2.2    SQPKSTVGTPAYIAPEILLRQEYDGKLADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDPQEPRDYRKTI
SnRK2.3    SQPKSTVGTPAYIAPEVLLRQEYDGKIADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDPEEPRDYRKTI
SnRK2.4    SRPKSTVGTPAYIAPEVLSRREYDGKMADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDQEDPKNFRKTI
SnRk2.5    SRPKSTVGTPAYIAPEVLSRREYDGKHADVWSCGVTLYVMLVGGYPFEDPDDPRNFRKTI
SnRK2.6    SQPKSTVGTPAYIAPEVLLKKEYDGKVADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDPEEPKNFRKTI
SnRK2.7    SQPKSTVGTPAYVAPEVLSRKEYNGKIADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDPEDPRNIRNTI
SnRK2.8    SQPKTTVGTPAYIAPEVLSTKEYDGKIADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDPSDPKDFRKTI
SnRK2.9    SNPKSTVGTPAYIAPEVFCRSEYDGKSVDVWSCGVALYVMLVGAYPFEDPKDPRNFRKTV
SnRK2.10   SMPKSTVGTPAYIAPEVLSRGEYDGKMADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDQEDPKNFKKTI
consensus  SqPKsTVGTPAYiAPEvlsrrEYdGKlaDVWSCGVtLYVMLVGaYPFEDpedPknfrkTi
```

```
SnRK2.1    QRIMAVQYKIPDYVHISQECKHLLSRIFVTNSAKRITLKEIKNHPWYLKNLPKELLESAQ
SnRK2.2    QRILSVTYSIPEDLHLSPECRHLISRIFVADPATRITIPEITSDKWFLKNLPGDLMDENR
SnRK2.3    QRILSVKYSIPDDIRISPECCHLISRIFVADPATRISIPEIKTHSWFLKNLPADLMNESN
SnRK2.4    QKIMAVQYKIPDYVHISQDCKNLLSRIFVANSLKRITIAEIKKHSWFLKNLPRELTETAQ
SnRk2.5    QRIMAVQYKIPDYVHISQECRHLLSRIFVTNSAKRITLKEIKKHPWYLKNLPKELTEPAQ
SnRK2.6    HRILNVQYAIPDYVHISPECRHLISRIFVADPAKRISIPEIRNHEWFLKNLPADLMNDNT
SnRK2.7    QRILSVHYTIPDYVRISSECKHLLSRIFVADPDKRITVPEIEKHPWFLKGPLVVPPEEEK
SnRK2.8    GRILKAQYAIPDYVRVSDECRHLLSRIFVANPEKRITIEEIKNHSWFLKNLPVEMYEGSL
SnRK2.9    QKIMAVNYKIPGYVHISEDCRKLLSRIFVANPLHRSTLKEIKSHAWFLKNLPRELKEPAQ
SnRK2.10   QRIMAVKYKIPDYVHISQDCKHLLSRIFVTNSNKRITIGDIKKHPWFLKNLPRELTEIAQ
consensus  qrImavqYkIPdyvhiS-eCrhLlSRIFVanpakRiti-eIk-h-WfLKnlpkel-e-aq

SnRK2.1    AAYYKRDT----SFSLQSVEDIMKIVGEARNPAPSTSAVKSSGSGAD------E---EEE
SnRK2.2    MGSQFQEPEQ----PMQSLDTIMQIISEATIPT------VRNRCLDDFMADNLD--LDDD
SnRK2.3    TGSQFQEPEQ----PMQSLDTIMQIISEATIPA------VRNRCLDDFMTDNLD--LDDD
SnRK2.4    AAYFKKEN---PTFSLQTVEEIMKIVADAKTPPPVSRSIGGFGWGGNGDADGKEEDAEDV
SnRk2.5    AAYYKRET---PSFSLQSVEDIMKIVGEARNPAPSSNAVKGFDDDEEDVEDEVE---EEE
SnRK2.6    MTTQFDESDQ----PGQSIEEIMQIIAEATVPP------AGTQNLNHYLTGSLD--IDDD
SnRK2.7    CDNGVEEEEEEEEKCRQSVEEIVKIIEEARKGVN---GTDNNGGLG-LIDGSID--LDDI
SnRK2.8    MMNGP---------STQTVEEIVWIIEEARKPITVATGLAGAGGSGGSSNGAIG--SSSM
SnRK2.9    AIYYQRNVNL-INFSPQRVEEIMKIVGEARTIPNLSRPVESLG---------------SDK
SnRK2.10   AAYFRKEN---PTFSLQSVEEIMKIVEEAKTPARVSRSIGAFGWGGGEDAEGKE---EDA
consensus  aayy-re------fslQsveeImkIvgeAr-p---t--v-g-g--a--m-d-le---ede

SnRK2.1    EDVEAEVEEEEDDEDEYEKHVKEAQSCQESDKA-
SnRK2.2    MD-DFDSE-SEIDVDSSGEIVYAL----------
SnRK2.3    MD-DFDSE-SEIDIDSSGEIVYAL----------
SnRK2.4    EEEEEEVEEEEDDEDEYDKTVKEVHAS-GEVRIS
SnRk2.5    EEEEEEEEEEEEEEDEYEKHVKEAHSCQEPPKA-
SnRK2.6    MEEDLESDLDDLDIDSSGEIVYAM----------
SnRK2.7    DDADIYDDVDDDEE-RNGDFVCAL----------
SnRK2.8    DLDDLDTDFDDID---TADLLSPL----------
SnRK2.9    KDDDEEEYLDANDEEWYDDYA-------------
SnRK2.10   EEEVEEVEEEEDEEDEYDKTVKQVHASMGEVRVS
consensus  eded-e-e-eedded-y-e-v--l----------
```