

Caracterización molecular del complejo SnRK1 de maíz

Cristina López Paz
Barcelona, Abril 2007

Universitat de Barcelona
Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Programa de doctorado en Biotecnología
Bienio 2002-2004

Caracterización molecular del complejo SnRK1 de maíz

Memoria presentada por Cristina López Paz para optar al grado de Doctor
por la Universitat de Barcelona

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratori de Genètica Vegetal de Consorci CSIC-
IRTA, bajo la dirección de la Dra. Montserrat Pagès Torrens y la Dra. Victoria
Lumbreras Ruíz, y financiado por una beca FI 2003 de la Generalitat de Catalunya.

Las Directoras:

Dra. Montserrat Pagès Torrens

Dra. Victoria Lumbreras Ruíz

La autora:

La tutora

Cristina López Paz

Dra. Montserrat Busquets Abió

A mis padres

A Igor

AGRADECIMIENTOS

Llegar hasta aquí ha sido duro, pero sin duda hubiera sido imposible sin la ayuda de un montón de personas, que han hecho que esta etapa sea una experiencia inolvidable, y que ahora merecen un reconocimiento especial

En primer lugar quiero agradecer a la Dra Montserrat Pagès, por haberme permitido incorporar en su grupo de investigación, y darme la oportunidad de aprender así muchísimas cosas. Gràcies, Montse, per la teva dedicació, consells i ànims en els moments més crucials, així como per estar sempre disposada escoltar-me.

A la Dra. Victoria Lumbreras. Por dirigirme, guiarme y enseñarme muchísimas cosas. Muchísimas gracias, por tu ayuda, tus críticas, tus consejos, tus ideas, tus ánimos...y sobre todo por tu paciencia, que ya sé que no es fácil aguantarme tanto tiempo y soportar todas mis crisis y neuras.

A la Dra. Montserrat Busquets, per facilitar com a tutora tots els tràmits burocràtics.

Al Dr. Ignacio Fita y a su grupo de investigación, con el que se ha colaborado en la parte de caracterización estructural del dominio KIS. Especialmente a Eva, por ayudarme en todo la parte de purificación e intentos de cristalización, y a Jeni por su ayuda con el FPLC.

Al Dr. Csaba Koncz, en Colonia, por acogerme en su laboratorio. A todos los miembros: a Zuzcsa, que me ayudó a sentirme como en casa, a Gergo y Mishi, por su ayuda durante todo el período. A Ela, Thomek, Esmeralda y Giovanni que hicieron mi estancia allí más agradable.

A todos los miembros del laboratorio azul, cuyo apoyo ha sido fundamental, a los de ahora y a los que ya no están, porque ha sido un placer trabajar con todos:

A la Dra. Adela Goday, porque fue quien me inició un poco en todo esto, con la historia de px2, los western... gràcies Adela pels teus consells i la teva predisposició a ajudar durant tot aquest temps.

A l'Eva, per les seves idees, comentaris i crítiques sobre el treball, i els moments compartits durant aquest quatre anys. Gràcies Eva pel teu humor, els teus ànims han sigut fonamentals .

A Marta, por ser quien me inició en el mundo de las quinasas. Gràcies per ensenyar el teu gran coneixement sobre CK2 i iniciar-me en moltes de les tècniques que he utilitzat en aquest treball. Gràcies per l'ajuda i discussions durant aquest curt període en què hem tornat a coincidir, ha sigut una una sort tornar a treballar amb tu!

Sin duda, a mis compañeros de poyata más fieles durante estos cuatro años y con quiénes he compartido grandes momentos : Paula, Alicia y Sami. Sois geniales, ¡cuánto os voy a echar de menos! de cada uno he aprendido un poco, o eso he intentado. Gracias Paula, por tu

ayuda, tu experiencia, tu bondad, ¡y tu fuente de sabiduría! Ha sido una suerte poder trabajar contigo, pero más aún conocerte. A Alicia, por su ayuda en muchísimos aspectos, personal y profesional. Por los momentos compartidos, las risas, broncas, ese carácter! que a veces da miedo, pero que en el fondo delata que eres encantadora! A Sami, ¡uf! cuántas cosas, ¡no me van a caber! tu gran ayuda, discusión, críticas... he aprendido muchísimo (¡de verdad! aunque te pregunte siempre lo mismo), pero sobre todo gracias por tu gran apoyo moral. No me olvido de tu refranero, tu discografía y de advertirme siempre que *de lo que come el grillo, poquillo*.

A los nuevos chicos, a Michael y Belmiro, sois encantadores, gracias por aportar esa alegría al laboratorio. Que bien me han venido tus protocolos de SOD, Belmiro, gracias! A Imen, por su amabilidad, y por no reirse, o no mucho, de las barbaridades que he llegado a decir en "francés" A los ex-azules, que dejaron también su marca y siempre estuvieron dispuestos a ayudar. Loren, ¡has dejado huella, eh! por las risas, tus consejos, esos tiempos de body paper..., te echamos de menos! a Javi, Claudia y todos los chicos de prácticas y Erasmus que han pasado por el lab...

A todos los con los que he compartido momentos inolvidables fuera y dentro del lab y que han hecho que el CSIC se convierta casi en una segunda casa. A todos los compañeros de la cuarta y de la sexta, que siempre han prestado su ayuda y contribuido a que todo sea más sencillo .

A Valeria. Cuántas cosas compartidas desde aquella compra de zapatillas en el Caprabo! Ya casi estamos Vale! llevar las penas entre dos ha hecho que no resulte tan duro, GRAZIE MILLE! Por todos los momentos, por estar ahí en los malos y en los buenos, que son muchísimos y no caben aquí. Por tu infinita ayuda, (que hubiera hecho yo si no hubiera tenido quien me recordara que tengo que renovar la beca, la matrícula y mil cosas más que ya olvidé!). Pero sobre todo... gracias por tu amistad y por ser como eres.

A Núria, gràcies pels teus ànims, la teva amistat, esa alegría que desprendes en el pasillo...no canviis! ¡ah! y por hacerme sentir un poquito mejor al descubrir que hay alguien casi tan torpe como yo, (je, je..) Gràcies per saber escoltar-me, fer-me treure un somriure en els moments difícils i per tota l'ajuda que no cal que mencioni. Por cierto , cuando vuelve el equipo Gym? No puede desmontarse, ¡eh!

A Maite, no sólo por su ayuda técnica, que es mucha, y su predisposición a ayudar en cualquier momento y para cualquier cosa, sino también por su amistad y por esos buenos momentos acompañados de una cervecita y de las mejores tapas de BCN.

Al laboratorio negro. A David, por amenizarnos de cuando en cuando con sus temas, pero también por sus consejos y ayuda, aunque al final he descartado tu idea sobre la portada. A Silvia, por su amabilidad y estar siempre dispuesta a responder cualquier duda. A Imma, por mantener el orden del hot, a pesar de esas broncas tan frecuentes por los dosímetros! A los verdes, que casi me han adoptado por mi presencia continua y el robo constante de material. A

Carlos y a Ignacio, siempre ahí para cualquier problema. A Hédia, espero escribirlo bien, ya que después de dos años me he dado cuenta que era yo la que no sabía pronunciarlo. Por sus ánimos y contagiosa risa. A los que ya no están, a Cristian, por su paciencia sin límite y todos los buenos momentos compartidos, que no se olvidan. A Sergi, que des de l'altra banda de la Diagonal ha continuat estant allà per cèl.lules, plàsmids...i tot el que se li demani. A los rojos, de ahora y antes. A Lola, Marga i Imma per tenir sempre un moment durant aquest temps per ajudar sobre qualsevol tema i resoldre els mil dubtes que tenia sobre proteïnes, diàlisis, tincions...Als antics vermells i als més recents, Eli (la teva paciència amb nosaltres y el corel Draw!), Marc, Pau, Soraya, Meri... A los naranjas, vecinos de lab, Victor, Matilda y Carles, ex taronja A los lilas, a Jaume, Irma, Anahit, Jordi y Céline. A los Amarillo-rosas: A Bea, porque si hubiera más personas como tú todo funcionaría mejor. A Laura, que gracias a ella todos los trámites se han hecho más sencillos. A Jordi, pels seus ànims i consells. A Sonia, que bien alguien que ya haya pasado por esto y tenga todo a punto y ¡tan bien organizado! A María por sus comentarios y discusión sobre peroxisomas, mitocondrias.... A Bia, Silvia, Christelle, Lidia, y a las que ya no están Elisenda y Marta. Al laboratorio gris. A Pep, que cedió al laboratorio la librería de embrión de maíz utilizada en este trabajo. A Néstor, Enric, Céline. A toda la demás gente de la sexta y de la cuarta: a Nahuel, que te saca una sonrisa o un susto cada vez que te lo encuentras; a Mariano, por sus charlas y discusión sobre mitocondrias; a Juan, que desde farmacia, me salvó en los últimos experimentos con sus células de arabidopsis; a Sergi, Cristinas, Maida, Meri, Ana ..y a todos los que han ido llegando o han pasado por el departamento durante todo este tiempo,! siempre dispuestos a echar un cable ¡gracias!

Al servicio de invernaderos. A Montse, por su paciencia y gran ayuda durante todo este período, y todos los intentos que hemos hecho por aclarar la localización de $\beta\gamma$ (las plantas de GFP, los callos, los cultivos...), moltíssimes gràcies Montse! A Pilar por su gran trabajo, facilitarnos siempre las cosas, y proporcionarnos cada año nuestros maíces. A todos los que contribuyen a que todo marche bien: Alejandro, Eva, César y Leire

Al servicio de secuenciación, Mercè y Mireia, que me han salvado más de una vez cuando he perdido mis secuencias!

A Raúl, por su ayuda y disponibilidad con todos los problemas informáticos, que no han sido pocos.

A Ángel, por su ayuda técnica con las imágenes y su paciencia para enseñar esos truquillos que él tan bien domina.

A Mónica, por enseñarme a utilizar el microscopio confocal y su ayuda continua.

A los que han contribuido o contribuyen para que todo funcione en el departamento. A Mina, que nos facilita mucho las cosas y alegra las mañanas, con su bon dia , su sonrisa y esas ganas de hablar ¡ ánimo! A Luís y Cristina. A Dani, un poco azul también, y el tío más "dulce y delicado" del departamento.

A toda la gente que fuera de este ámbito me ha ayudado también, en otros aspectos, no científicos pero igual o más importantes.

A las que me han aguantado fuera del lab, especialmente a Marian por todos los momentos compartidos desde la resi, que han sido muchos, pero también a mis ex -compañeras de piso Esther, María y Clara. A las que siempre han estado ahí, aunque a veces más lejos, pero siempre cerca para escucharme, a Fani y a Vicky, ¡nos encontramos en breve!

A los más importantes para mí: a mi familia, de quien siempre he tenido un gran apoyo. A todos, desde mi familia en Galicia, a la parte que me ha acogido en Euskadi, muchísimas gracias, por entender el poco tiempo que muchas veces os he dedicado. Abuelos: ¡ahora sí que acabo, eh!

A Gon, por su paciencia conmigo, por transmitir esa tranquilidad, y portarse muchas veces como el hermano mayor, ¡eres un crack! ¡qué haría yo sin ti! A Alicia, por su cariño y dulzura. A mis padres, porque sin duda, sin su apoyo no hubiera llegado hasta aquí. Especialmente a mi madre, por ser la mujer que más admiro y el modelo que siempre intento seguir

A Igor, por tantas y tantas cosas... Por estar a mi lado durante todos estos años, desde el principio al final. Porque tu apoyo incondicional ha sido indispensable . Por compartir la vida conmigo. Por todos los momentos vividos y todos los proyectos que nos quedan por cumplir.

...A todos y todas los que siempre habéis estado ahí y habéis confiado en mí, ¡GRACIAS!

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos fotoautótrofos, capaces de producir los carbohidratos que necesitan y llevar a cabo al mismo tiempo, y en diferentes tejidos, fotosíntesis, respiración y fermentación. Los carbohidratos producidos en hojas maduras, son transportados vía floema para permitir el desarrollo de tejidos en crecimiento, abastecer los tejidos heterotróficos, o ser almacenados como anticipación a condiciones menos favorables. Esta coordinación es posible gracias al desarrollo de un sistema de señalización por azúcares que permite integrar diferentes señales metabólicas, ambientales y del desarrollo.

La glucosa, además de su importancia como fuente de carbono principal para muchos organismos, es una molécula reguladora, clave en el control de la fisiología celular, metabolismo, ciclo celular, desarrollo y expresión génica. En plantas superiores, los azúcares, incluida la glucosa, modulan numerosos procesos que van desde la germinación de la semilla hasta la última etapa de senescencia. El papel de los azúcares como reguladores, ha sido estudiado en mayor profundidad en organismos unicelulares, que deben enfrentarse a situaciones ambientales continuamente diferentes y en muchas ocasiones adversas, lo cual obliga a un reajuste continuo del metabolismo según la disponibilidad de nutrientes. Uno de los organismos modelo en el estudio de la vía de señalización de glucosa es la levadura *S. cerevisiae*, probablemente en parte por la importancia biotecnológica de su fermentación alcohólica.

El complejo SNF1/AMPK/SnRK1, conservado en todos los organismos eucariotas estudiados, juega un papel clave en el control del metabolismo y la vía de señalización por azúcares. En levaduras y mamíferos, organismos dónde ha sido ampliamente estudiado, este complejo quinasa se activa ante situaciones de privación de glucosa o condiciones de estrés que disminuyen significativamente las reservas energéticas de la célula.

Como introducción a la vía de señalización por azúcares, se describen en primer lugar los componentes, así como los mecanismos de percepción y transducción, identificados en levadura, para una mayor comprensión *a posteriori* de lo que sucede en organismos más complejos como las plantas. En segundo lugar, se describirá el complejo SNF1, en función de la información disponible de levaduras, mamíferos y plantas, haciendo especial hincapié en el complejo vegetal, SnRK1.

1. Señalización por azúcares

1.1 Vías de señalización por glucosa en levadura

La falta de nutrientes es una de las adversidades más comunes a las que se enfrentan los organismos unicelulares, que han desarrollado mecanismos para responder a estas variaciones extremas y regular su crecimiento y desarrollo. El modelo de estudio *S. cerevisiae* es un organismo anaeróbico facultativo, pero incluso en la presencia de oxígeno prefiere, a pesar de su menor eficiencia, la fermentación de azúcares como la glucosa, la fructosa o la sacarosa, a la respiración oxidativa. Para regular su metabolismo y procesos biológicos en función de la disponibilidad de nutrientes, estos organismos han desarrollado diferentes vías de señalización de glucosa para el uso óptimo y exclusivo de esta preciada fuente de carbono (figura 1).

La primera de estas vías es la conocida como *vía de represión por glucosa* en la que, como su nombre indica se reprime la expresión de genes involucrados en los procesos de respiración, gluconeogénesis y del metabolismo de fuentes de carbono alternativas (Schüller, 2003). La activación por glucosa de esta vía requiere a la enzima con función catalítica y sensora hexoquinasa2 (Hxk2) que, mediante su interacción con la proteína fosfatasa1, formada por las subunidades Reg1/Glc7, defosforila e inactiva un componente clave en esta vía que es la proteína quinasa SNF1. El complejo SNF1, está formado por una subunidad catalítica (SNF1), una subunidad reguladora (SNF4) necesaria para su actividad (Jiang and Carlson, 1996), y diferentes subunidades β que actúan de nexo entre las dos anteriores y son las responsables de la especificidad de sustrato y la localización subcelular de SNF1 (Schmidt and McCartney, 2000; Vincent, et al., 2001). En ausencia de glucosa, SNF1 es activa y fosforila y causa la translocación a citoplasma del factor de transcripción Mig1, permitiendo así la expresión de genes necesarios para la utilización de fuentes de carbono alternativas (DeVit and Johnston, 1999). El complejo SNF1 tiene múltiples efectos en la célula como la inhibición de vías biosintéticas y la modulación de la expresión génica, que ejerce a través de mecanismos como la interacción con la RNA polimerasa II (Kuchin et al., 2000) o la fosforilación de Histona III (Lo et al., 2001). Por otro lado, en presencia de glucosa, la proteína Hxk2 se transloca al núcleo donde interacciona con el factor de transcripción Mig1, para formar un complejo estable que recluta a proteínas corepresoras (Moreno et al., 2005), e impide

así la transcripción de genes relacionados con el metabolismo de otras fuentes de carbono.

Debido a la baja eficiencia en la producción de energía, el metabolismo fermentativo necesita un elevado flujo glicolítico. Esto se controla a través de una segunda vía, que tiene como finalidad, la inducción de la expresión de los transportadores de glucosa (Hxt) con afinidad y capacidad adecuada en función de la concentración extracelular (Johnston M, 2005). La diversidad de transportadores de *S.cerevisiae* (Hxt1-17, Gal 2, Snf3 y Rgt2), con diferentes afinidades y patrón de expresión es un reflejo de la sofisticación de este mecanismo. Dos proteínas homólogas a Hxts pero sin actividad catalítica, Snf3 y Rgt-2, funcionan como sensores de glucosa extracelular, de alta y baja especificidad, respectivamente. Esta vía de *inducción por glucosa* actúa en parte, a través de la inactivación del represor de transcripción Rgt-1, mediante degradación por proteasoma de sus proteínas interactoras Std1 y Mth1. Se ha postulado que Snf3 y Rgt2 generan una señal en presencia de glucosa capaz de activar a la proteína caseína quinasa I que fosforilaría a Std1 y Mth1 provocando su exporte del núcleo y la degradación por proteasoma a través de SCF (E3 ubiquitin ligasa).

La tercera vía de señalización por glucosa es la de señalización por PKA y AMPc y se desencadena a partir de la señal producida por dos mecanismos diferentes (Rolland et al., 2002a). El incremento en AMPc provocado por la enzima adenilato ciclasa (AC) resulta en la activación de la proteína quinasa A dependiente de AMPc (PKA) capaz de iniciar una cascada de fosforilaciones que permitirá un crecimiento rápido en fuentes de carbono fermentables. La glucosa extracelular es percibida por el sistema de receptores acoplado a proteína G, que consiste en el receptor, la proteína G heterotrimérica (Gpa2) y Rgs2, un regulador negativo de la señalización. El segundo mecanismo de activación requiere el importe y la fosforilación de glucosa, sugiriéndose que la actividad hexoquinasa activaría a la proteína Ras, necesaria para la actividad basal de AC. La activación de PKA además de estimular la actividad glicolítica, promueve la síntesis proteica, reduce la resistencia a estrés durante el crecimiento en glucosa e integra esta señal con la de otras fuentes de nutrientes como fósforo, azufre o nitrógeno.

Los efectos inducidos por glucosa pueden ser debidos al efecto de sus metabolitos mediante activación o inactivación alostérica de enzimas glicolíticos, sin necesidad de una vía de transducción de señal (Rolland et al., 2002a). Los principales reguladores alostéricos de la glicólisis parecen ser la fructosa-2,6bisP y fructosa-

1,6bisP, controlando así dos de los pasos irreversibles que realizan la fosfofructoquinasa (PFK) y la piruvato quinasa (PK). Sin ser metabolitos intermediarios de la glicólisis, otros compuestos como la trehalosa-6-P, producida a partir de la glucosa-6-P, podrían actuar como inhibidores de hexoquinasas. El control de la entrada de glucosa en la vía de glicólisis requiere al enzima trehalosa-6-P sintasa (TPS), y mutantes *tps1* presentan una severa desregulación de la glicólisis después de la adición de glucosa en el medio (Thevelein and Hohmann, 1995).

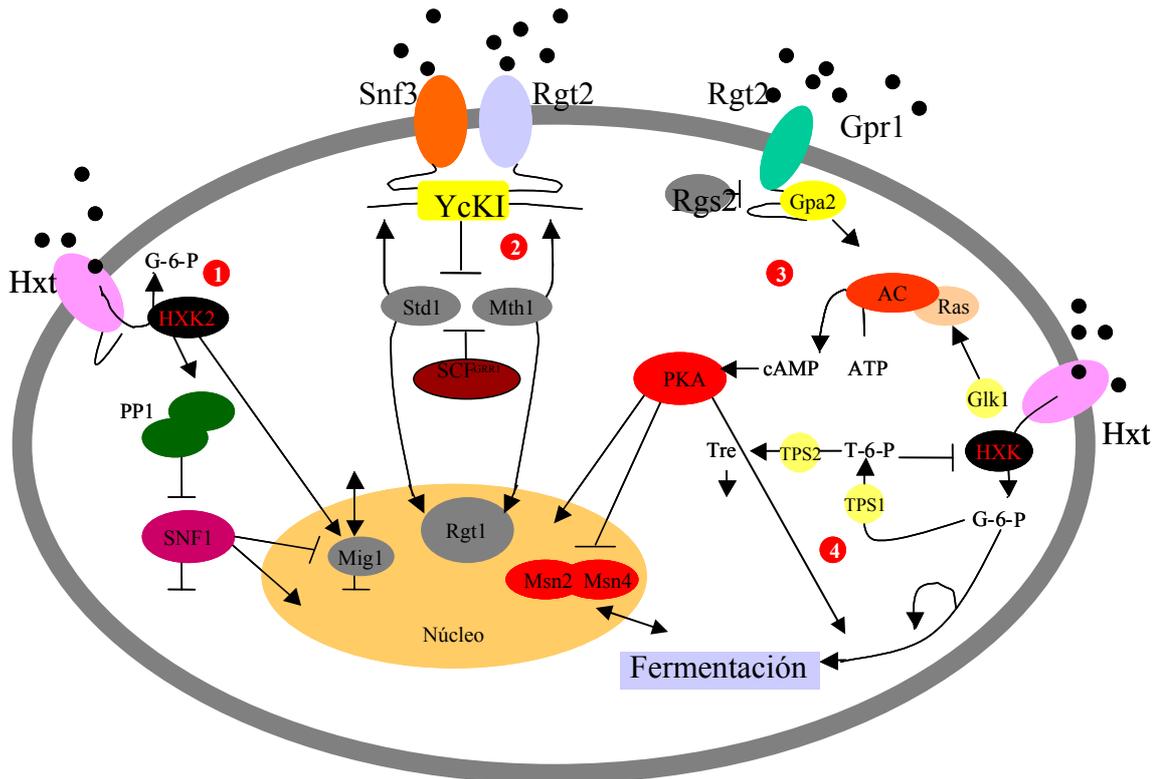


Figura1. Modelo de los mecanismos de percepción y transducción de señal por glucosa. (1) Vía principal de represión por glucosa: hexoquinasa 2 (HXK2), proteína fosfatasa 1 (PP1) y el complejo SNF1 son necesarios para la desrepresión de genes en ausencia de glucosa a través de la inhibición del represor Mig1. (2) Vía de inducción de glucosa por transportadores de hexosas: *snf3* y *Rgt2* funcionan como sensores de glucosa activando la proteína casein quinasa I (YckI) y generando una señal que resulta en la expresión de nuevos transportadores. (3) Vía dependiente de proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) con un sistema dual de percepción de señal: el receptor asociado a proteína G (Gpr1) y la señalización a través de la fosforilación de glucosa. (4) Control de la actividad glicolítica y la expresión génica a partir de metabolitos intermediarios u otros componentes como la trehalosa-6-P. Los niveles de glucosa vienen indicados por círculos negros. Adaptado de Rolland et al., 2006.

1.2 Vía de señalización por azúcares en plantas

En plantas, la señalización y regulación por azúcares es mucho más compleja que en los organismos unicelulares, debido a las largas distancias y a la necesidad de una señalización específica a nivel de tejido, o incluso célula, así como la coordinación con los cambios de desarrollo, fisiológicos y ambientales.

La producción de azúcares a través de la fotosíntesis es un proceso vital que se coordina y regula a través de los mismos azúcares producidos (Koch, 1996; Sheen et al., 1999). El metabolismo de azúcares es un proceso muy dinámico y complejo debido a que sus componentes varían durante el desarrollo (Borisjuk et al., 1998; Borisjuk et al., 2003), en respuesta a señales ambientales como cambios diurnos (Bläsing et al., 2005), y estrés de tipo abiótico y biótico (Gupta and Kaur, 2005; Roitsch and González, 2004). La integración de las señales ambientales con el metabolismo es especialmente importante para los organismos sésiles, y por ello, la señalización por azúcares tiene que estar integrada con la disponibilidad de otros nutrientes esenciales como nitrógeno, fósforo o sulfato, así como con las condiciones de luz. Estudios recientes han demostrado la regulación circadiana de muchos de los enzimas implicados en fotosíntesis, crecimiento y desarrollo, lo cual confiere una ventaja a la planta al poder anticiparse a las fuentes de carbono disponibles (Dodd et al., 2005).

La fotosíntesis y el metabolismo y distribución del carbono están sujetos a un riguroso control entre tejidos llamados productores (*source*) y tejidos de almacenamiento o consumo (*sink*) (Rolland et al., 2006). Aunque la sacarosa es el principal producto fotosintético transportado a través del floema, muchos de los efectos de señalización en procesos de crecimiento y desarrollo se atribuyen a hexosas como glucosa, fructosa y más recientemente, trehalosa (Smeekens, 2000). Los efectos de la sacarosa pueden ser, en muchos casos, sustituidos completamente por hexosas. Un ejemplo es la represión de genes fotosintéticos, que puede ser inducida por concentraciones más bajas de hexosas, confirmando así, que la sacarosa no es siempre la molécula señalizadora (Sheen et al., 1999). En algunos procesos como la regulación de un transportador de glucosa (Chiou and Bush, 1998), o el control transcripcional del factor bZIP, ATB2 (Rook et al., 1998), la función de la sacarosa no puede ser sustituida por hexosas, indicando la especificidad de este mecanismo de señalización.

En la figura 2 se resume el control entre producción y consumo en diferentes tejidos de la planta. En los tejidos productores como hojas maduras, concentraciones

bajas de azúcares promueven la fotosíntesis, la movilización de reservas y el exporte, mientras que concentraciones altas de azúcares promueven el crecimiento y el almacenamiento (Koch, 1996). Este riguroso control del metabolismo sucede a través de diversos mecanismos moleculares como la represión génica, la regulación de la estabilidad del mRNA, la renovación de proteínas o la modulación enzimática.

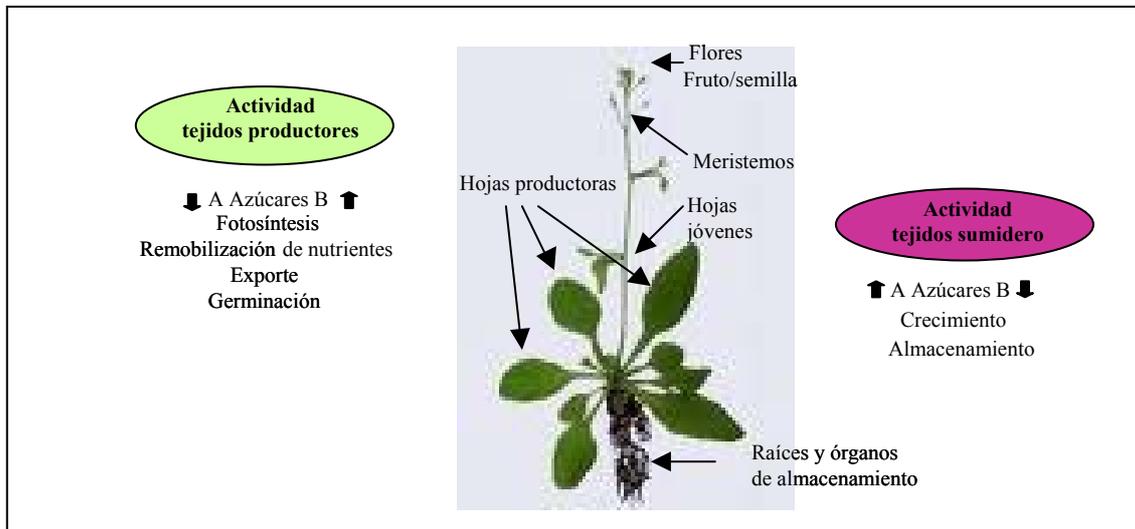


Figura 2. Efecto de los azúcares en la actividad de los tejidos productores (derecha) y tejidos sumidero(izquierda). A y B: niveles azúcar altos y bajos respectivamente; **↑↓**: actividad metabólica de los tejidos; adaptado de Rolland et al., 2002b.

1.2.1 El papel de los azúcares en el desarrollo y la adaptación ambiental

El descubrimiento del papel de los azúcares como reguladores en procesos de desarrollo y crecimiento, independientemente de su importancia como fuente de carbono, así como su interacción con vías de señalización hormonal, ha llevado a considerarlos como nuevas fitohormonas (Rolland et al., 2002b; León and Sheen, 2003; Rolland et al., 2006).

Como ya se ha mencionado anteriormente, los azúcares modulan procesos vitales para la planta desde los estadios más iniciales, como la formación de la semilla, hasta los últimos estadios, como la senescencia. Estudios realizados en *V. Fava* demuestran una correlación entre división celular y altas concentraciones de hexosas durante el desarrollo de los cotiledones (Borisjuk et al., 1998). El papel como promotor de la división celular se sugiere también a partir de estudios del mutante *wrinkled* de *arabidopsis*, deficiente en un factor de transcripción, *APETALA2*, que controla la expresión génica y la actividad necesaria para la conversión de sacarosa en precursores

de triacilglicéridos. El embrión de este mutante, presenta un mayor número de células, y de mayor tamaño, que se asocia al incremento en la concentración de hexosas respecto a la de sacarosa (Ohto et al., 2005). Durante la germinación, el suministro de azúcares externos permiten germinar aún en presencia de ABA (Finkelstein and Lynch, 2000; Garcíarrubio et al., 1997). Por otra parte, la germinación retardada por glucosa es dependiente de ABA, pero no causada por un incremento en su concentración (Dekkers et al., 2004). Las relaciones entre ABA y glucosa son complejas pues dependen de sus concentraciones así como del estado de desarrollo de la planta, lo cual sugiere que existen varias de vías de señalización específicas (Rolland et al., 2006). La distribución espacial y regulada de genes implicados en el metabolismo de carbohidratos, en el meristemo apical de tomate, demuestra la importancia de los azúcares durante el desarrollo (Pien et al., 2001). El suministro de azúcares en la parte aérea de la planta promueve la floración en condiciones de oscuridad y la adición en el medio de un 1% de sacarosa restablece el fenotipo de floración tardía de muchos genes (Roldán et al., 1999). Esta función de los azúcares como reguladores en procesos de reproducción es también compleja, pues existen de nuevo variaciones en las respuestas según la concentración utilizada.

A lo largo de la vida de la planta, ésta se enfrenta a situaciones adversas como es la falta de nutrientes, y debe responder parando su crecimiento y redirigiendo su metabolismo hacia procesos energéticamente más bajos para poder sobrevivir (Contento et al., 2004). Muchas situaciones de estrés ambiental como la sequía, el frío o la salinidad provocan alteraciones en el metabolismo de carbohidratos (Hare et al., 1998; Thomashow, 1999; Wanner and Juntilla, 1999; Kaur et al., 2000), y la vía de señalización por azúcares interacciona con vías de estrés con el fin de modular el metabolismo.

Por último, en la fase final del ciclo vital, como es el período de senescencia de la hoja, coincide un aumento de azúcares con el decline en el contenido de clorofilas y la actividad fotosintética, además de existir una relación entre la expresión del sensor hexoquinasa y el proceso de senescencia (Quirino et al., 2000; Dai et al., 1999).

1.2.2 Interacción de las vías de señalización de azúcares con vías hormonales

Debido al importante y complejo papel que juegan los azúcares en el control del metabolismo de la planta durante el crecimiento y el desarrollo, parece lógico que

interaccionen con otras vías de señalización hormonal, para así integrar de una forma más óptima las condiciones fisiológicas, los estímulos ambientales y los requerimientos de los diferentes órganos y tejidos. En la última década, estudios genéticos de mutantes de *A. thaliana* afectados en la respuesta a azúcares, han revelado numerosas conexiones entre la vía de señalización por azúcares y las vías hormonales clásicas, particularmente la del ácido abscísico y el etileno. Entre las estrategias seguidas para el aislamiento de estos mutantes destacan las que se basan en el efecto de altas concentraciones de azúcar en el medio, durante el desarrollo de la plántula, o en el cambio en la expresión de genes de respuesta a azúcares (Rook and Bevan, 2003). Según su respuesta, estos mutantes se han clasificado en diferentes grupos que se resumen en la Tabla 1.

Mutante	Condiciones del escrutinio	Nº mutantes aislados	Referencias
<i>cai, insensible a carbohidratos</i>	Desarrollo de la plántula con [N] baja (100mM) y 100mM sacarosa	35	Boxall, 1996; Martin, 2002
<i>gin, insensible a glucosa</i>	Desarrollo de la plántula en 330 mM glucosa	6	Zhou, 1998; Arenas-Huertero 2000
<i>glo, hipersensible a glucosa</i>	Parada en el desarrollo de la plántula a 220 mM glucosa	-	Rolland, 2002
<i>ggs, supersensible a glucosa</i>	Parada en el desarrollo de la plántula a 56 mM glucosa	22	Pego, 2000
<i>hba, beta amilasa alta</i>	Actividad amilasa en extractos proteicos de plantas crecidas en 175 mM sacarosa	2	Mita, 1997
<i>hsr, alta respuesta a azúcares</i>	Incremento en actividad de ApL3::Luciferasa en 34 mM sacarosa	>10	Handigham, 2002
<i>isi, deficiente en inducción por sacarosa</i>	Supervivencia de línea transgénica ApL3::P450 en 100mM sacarosa y el proherbicida R7402	>10	Rook, 2001
<i>lba, beta amilasa baja</i>	Actividad amilasa en extractos proteicos de plantas crecidas en 175 mM sacarosa	2	Mita, 1997
<i>mig, insensible a manosa en la germinación</i>	Germinación en 7,5 mM de manosa	72	Pego, 2000
<i>pr11, locus regulador pleiotrópico</i>	Crecimiento reducido de la plántula en 175 mM sacarosa	1	Németh, 1998
<i>ram, beta amilasa reducida</i>	Actividad amilasa reducida de plantas crecidas en un fotoperíodo de 12h en fondo <i>pgm</i>	>4	Laby, 2001
<i>rsr, respuesta a sacarosa reducida</i>	Expresión reducida de promotor patatina::GUS en 90 mM sacarosa	4	Martin, 1997
<i>sig, crecimiento insensible a sacarosa</i>	Desarrollo de la plántula en 350mM sacarosa	59	Pego, 2000
<i>sis, insensible a azúcares</i>	Desarrollo de la plántula en 300mM sacarosa	12	Laby, 2000
<i>sss, supersensible a sacarosa</i>	Inhibición de la germinación a 350mM sacarosa	37	Pego, 2000
<i>sus, desacoplado de sacarosa</i>	Represión reducida de la expresión del promotor de plastocianina fusionado a luciferasa en 88mM sacarosa	16	Dijkwell, 1997
<i>uns, respuesta a azúcar inusual</i>	Floración temprana y/o bajo contenido clorofilas en 146mM sacarosa, expresión génica de respuesta a azúcares alterada	4	Ohto, 2000; Ohto, 2001

Tabla 1. Resumen de diferentes escrutinios realizados para la obtención de mutantes en la respuesta a azúcares. Adaptada de Rook and Bevan, 2003.

La caracterización e identificación de estos mutantes ha revelado numerosas conexiones entre vías hormonales, al demostrarse que muchos de ellos son alélicos a mutantes ya caracterizados de vías hormonales como la del ácido abscísico. Así,

mutantes insensibles a glucosa como *gin5* o *gin6* han resultado ser alelos de genes de biosíntesis o de respuesta a ABA (ABA3 y ABI4, respectivamente)(Arenas-Huertero et al., 2000). El etileno tiene también varias conexiones con esta entramada vía de señalización. Análisis epistáticos sitúan a GIN1/ABA2 *downstream* del receptor de etileno ETR1 (Zhou et al., 1998). Por otra parte, el mutante *gin2* es relativamente insensible a auxinas y los mutantes resistentes a auxinas *axr1*, *axr2* y *tir1* son insensibles a altas concentraciones de glucosa. Callos de *gin2* son además hipersensibles a citoquininas, independientemente de la señalización por etileno. Los fenotipos de insensibilidad a glucosa de plantas con una respuesta constitutiva a citoquininas confirma los efectos antagonistas de la glucosa y las citoquininas (Rolland et al., 2006). En la figura 3 se muestra un modelo de la vía de señalización por azúcares y su interacción con otras hormonas, adaptado de Rolland et al., (2006).

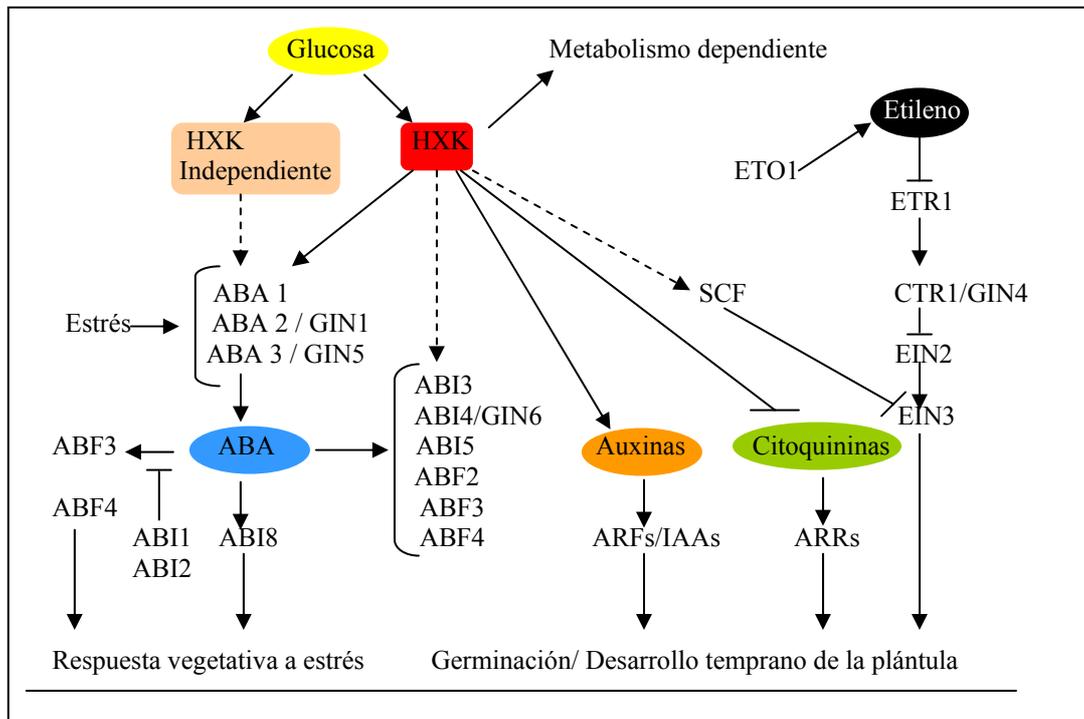


Figura 3. Modelo de las interacciones entre la vía de señalización por azúcares y otras vías hormonales deducidas a partir de estudios genéticos con mutantes de *A. thaliana*. La señalización por glucosa a través del sensor hexoquinasa (HXK) induce la expresión de genes de biosíntesis y repuestas a ABA a través de un incremento en esta fitohormona. La glucosa converge de manera antagonista con la vía del etileno regulando la estabilidad del factor de transcripción EIN3. La vía dependiente de hexoquinasa interacciona positivamente y negativamente con auxinas y citoquininas, respectivamente. Las conexiones hipotéticas se señalan con flechas punteadas. Adaptado de Rolland et al., (2006).

Toda esta red de interacciones, en la que todavía quedan muchos componentes por descubrir, y en la que se integran señales intrínsecas y extrínsecas, es probablemente la responsable de la plasticidad durante el desarrollo y el crecimiento de las plantas.

Las múltiples funciones que los azúcares son capaces de regular, la especificidad que ejercen en diferentes tejidos y estadios, así como su interacción con otras vías de señalización requiere a su vez múltiples sensores, transportadores, proteínas reguladoras y, probablemente mensajeros secundarios como el Ca^{2+} , capaces de transmitir la señal y otorgar una respuesta, que permita a la planta adaptarse a la nueva situación a través del control de su metabolismo. En plantas, los componentes de estas vías no están tan bien identificados como en levadura, y muchos de ellos se han caracterizado por analogía con el sistema de levadura.

A continuación se resume lo que se conoce sobre la percepción de la señal por azúcares en la célula vegetal y se sitúa a SnRK1, objeto de estudio de este trabajo, como importante regulador en el metabolismo de carbohidratos, en función del estado energético o la disponibilidad de azúcares por la célula.

1.2.3 Mecanismos de percepción y transducción de la señal de azúcares en plantas.

A pesar de que muchos de los componentes en la vía de señalización por azúcares están conservados entre levaduras, mamíferos y plantas, existen diferencias notables, como el hecho que la sacarosa es el principal azúcar transportado por las plantas, y regula respuestas específicas no afectadas por hexosas.

La célula vegetal posee diferentes transportadores de azúcares como los SUTs (Sucrose Transporters), capaces de transportar sacarosa con diferentes afinidades y estructuralmente relacionados con los transportadores HXT y GLUT de levaduras y mamíferos, respectivamente (Weise et al., 2000). En algunos tejidos la sacarosa se hidroliza en glucosa y fructosa por una invertasa localizada en la pared celular. El importe de glucosa puede realizarse a través de los transportadores de monosacáridos, STPs (Sugar Transporters), pero no el de fructosa, cuyo mecanismo de entrada en la célula no está claro (Halford and Paul, 2003). Se ha sugerido, aunque no hay datos experimentales que lo demuestren, que la expresión de diferentes invertasas y STPs permitiría a la célula cambiar la utilización de hexosas como respuesta a condiciones ambientales, implicando además a los STPs como moléculas sensoras de hexosas (Sherson et al., 2003). Otro de los receptores extracelulares identificados recientemente

es la proteína G heterotrimérica (Perfus-Barbeoch et al., 2004), implicada en el control de la germinación y el desarrollo de la semilla.

Una vez la glucosa ha entrado en la célula, la hexoquinasa juega un papel fundamental en la percepción y la transmisión de la señal por azúcares. A pesar de que ya en los años 90 existían evidencias de la función dual de la hexoquinasa en plantas, no se demostró claramente que la hexoquinasa estaba asociada a la percepción y señalización de azúcares hasta un trabajo de Moore et al. en el 2003, en qué mediante mutagénesis con uno de los genes HXK, se obtuvo un enzima que retenía la función de señalización, pero no la actividad catalítica. Los estudios con niveles alterados de hexoquinasa, o con la HXK heteróloga de levadura, han permitido distinguir y definir tres vías de señalización por glucosa en plantas (Sheen et al., 1999), que se detallan a continuación:

1) una vía hexoquinasa independiente, por la que se regula la expresión de genes como ASN1 (Asparagina sintasa) o β -AMY (β -amilasa), entre otros

2) una vía hexoquinasa y glicólisis dependiente, que requiere la actividad catalítica de HXK. Los metabolitos intermediarios como la glucosa 6-P (Toroser et al, 2000) o el acetato (Sheen et al., 1990) podrían ser los responsables de transmitir la señal de azúcares. Mediante esta vía se inducen los genes PR1 y PR5.

3) una vía hexoquinasa dependiente, independiente de metabolismo, que regula la expresión de genes CAB (proteína de unión a clorofila a /b) o NR1 (nitrato reductasa 1) independientemente de la actividad catalítica de hexoquinasa.

Como podemos observar en la figura 4, se conocen algunos de los metabolitos que pueden generar la señalización como son la glucosa, la trehalosa-6-P, la sacarosa o el metabolito AMP, que aunque no se refleja en la figura, es un indicador del estado energético de la célula como se comentará más adelante. La proteína hexoquinasa tiene un papel importante como sensor de los azúcares disponibles, y a parte de las ya caracterizadas HXK1 y HXK2, el genoma de *A. thaliana* codifica para otras cuatro hexoquinasas (HXL de hexokinase-like) (Rolland et al, 2006). La distribución de HXK y HXL en diferentes compartimentos subcelulares es un claro ejemplo de su participación en diferentes procesos. Además, su identificación como componente en un complejo multiproteico asociado a mitocondria es un indicador de la optimización entre la disponibilidad de sustrato y la coordinación entre el metabolismo y la demanda

energética (Giege et al., 2003). Como se espera del hecho de células fotosintéticas que generan glucosa a partir de la hidrólisis del almidón, el enzima principal en la fosforilación de glucosa en el hongo *Physcomitrella patens* se encuentra en el estroma de cloroplastos (Olsson et al., 2003). Sorprendentemente, también se ha localizado en núcleo dónde asociada a un complejo multiproteico controla la transcripción y degradación, mediada por proteasoma, de EIN3 (Yanagisawa et al., 2003). Similarmente a lo que ocurre en levadura, y también mamíferos, los componentes del complejo SnRK1 (nombre que recibe el complejo homólogo a SNF1 en plantas derivado de *SNF1-related protein kinase*) juegan un papel clave en el control de metabolismo celular, ejerciendo su función a través del mecanismo de fosforilación, que permite regular la expresión génica y modular la actividad de enzimas involucrados en el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos e isoprenoides.

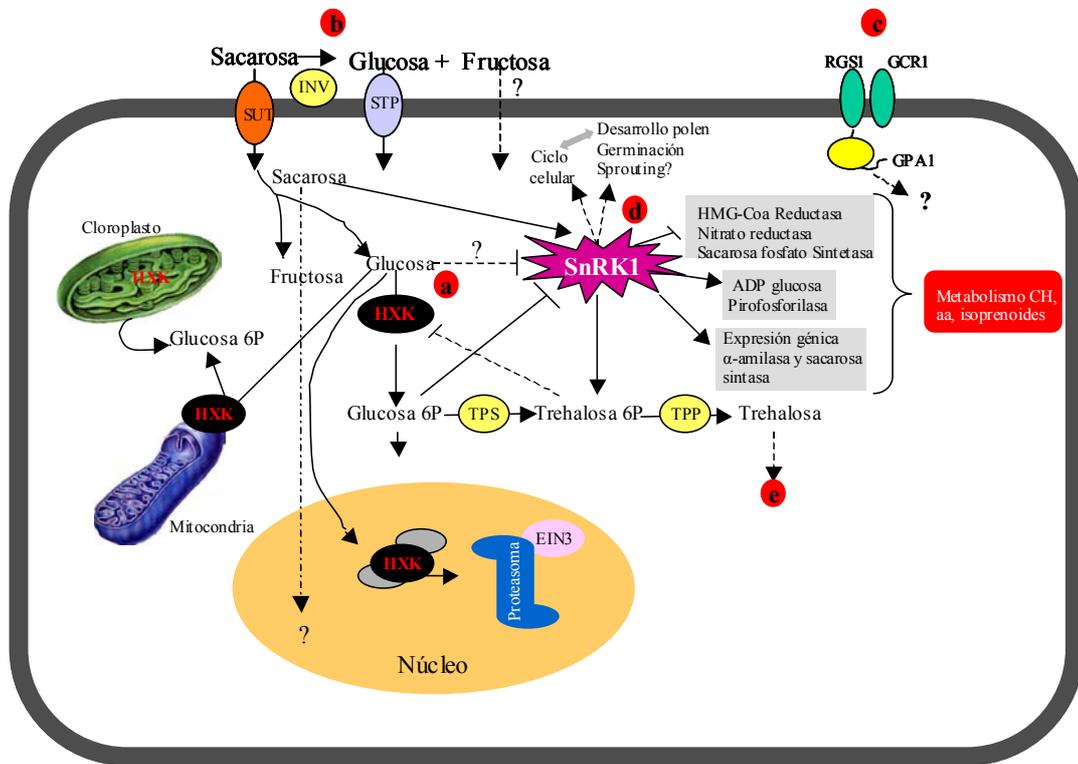


Figura 4. Modelo de señalización por glucosa en la célula vegetal. (a) El sensor hexoquinasa (HXK) se encuentra principalmente asociado a mitocondria pero también en núcleo, citosol y plastidios. (b) En la membrana plasmática se encuentran diferentes transportadores de disacáridos y hexosas que también podrían funcionar como sensores. La sacarosa altera de manera específica la expresión de factores de transcripción a través de un mecanismo desconocido. (c) Los receptores RGS1-GCR1 asociados a proteína G actuarían posiblemente en una vía hexoquinasa independiente. (d) El complejo SnRK1 juega un papel central en la transducción de señal fosforilando y modulando varios enzimas, y regulando la expresión génica. (e) La trehalosa también tiene un papel señalizador, aparentemente *downstream* de SnRK1. Las flechas discontinuas indican interacciones no confirmadas. Adaptado de Rolland et al., 2006 y Halford and Paul, 2003

2. La familia SNF1/AMPK/SnRK1

La familia SNF1 pertenece a la superfamilia de proteínas quinasas, formando parte del mismo grupo que las proteínas quinasas dependientes de calmodulina (CaMKs) de animales y las proteínas quinasas dependientes de calcio de plantas (CDPKs). La familia SnRK ha divergido y expandido en plantas formando dos subfamilias adicionales denominadas SnRK2 y SNRK3 (Halford et al., 2003). A diferencia de SnRK1, estas dos subfamilias muestran mayor divergencia a nivel de secuencia con SNF1 y son incapaces de complementar al mutante $\Delta snf1$ de levadura, sugiriendo por tanto una divergencia también a nivel funcional (Hrabak et al., 2003). En esta introducción, nos centraremos únicamente en la descripción de la subfamilia SnRK1.

Miembros de la familia SNF1 han sido descritos en levaduras, mamíferos (AMPK) y plantas (SnRK1), presentando gran similitud tanto a nivel de estructura como de funcionalidad (Hardie et al, 2006; Polge and Thomas, 2007). Probablemente, se trata de un sistema de señalización ancestral originado hace más de 1500 millones de años, tiempo en que se estima, se produjo la separación de los tres reinos. La conservación de las características de este complejo a lo largo de la evolución refleja la necesidad básica en todos los organismos, de controlar el metabolismo celular en función de la energía disponible. A pesar de tener un origen y funciones principales comunes, existen diferencias que sugieren que han evolucionado independientemente para desarrollar funciones más complejas en organismos multicelulares.

El papel fisiológico y la estructura de este complejo se conoce mejor en levadura y humanos que en plantas. Cabe destacar, los numerosos estudios realizados en humanos debido al papel que este complejo juega en la homeostasis de glucosa a nivel de organismo y su implicación en enfermedades como la diabetes o la obesidad, y procesos como el ejercicio o la hipoxia en músculo cardíaco.

Estudios realizados en plantas han confirmado la conservación de miembros de este complejo, pero además, han revelado la existencia de subunidades exclusivas en estos organismos que indicarían la adquisición de nuevas funciones a lo largo de la evolución (Polge and Thomas, 2007). A nivel funcional, diversos estudios han implicado a SnRK1 en el control del metabolismo a través de la fosforilación e inactivación de enzimas claves en vías biosintéticas, pero su papel puede ser más amplio, como se ha observado a partir de los efectos en el desarrollo provocados por la

sobreexpresión de construcciones sentido o antisentido de subunidades SnRK1 (Halford et al., 2003). Los estudios existentes sobre la regulación y función de SnRK1 se resumen más detalladamente en el apartado 2.2.

A continuación se describe lo que se conoce sobre la composición del complejo SNF1/AMPK/SnRK1 remarcando las diferencias existentes en plantas.

2.1 Composición y estructura del complejo SNF1: similitudes y diferencias entre los tres reinos

2.1.1. Componentes del complejo

El gen SNF1 (sucrose non-fermenting-1) fue originalmente descrito en levadura por mutaciones que impedían el crecimiento en fuentes de carbono diferentes de glucosa como sacarosa, rafinosa, maltosa, etanol o glicerol (Celenza and Carlson, 1986). SNF1 codifica para una proteína quinasa de 72 kDa y su mutación afecta no sólo al metabolismo sino a procesos de desarrollo como la meiosis y la esporulación (Honigberg and Lee, 1998), la filamentación y el crecimiento invasivo (Cullen and Sprague, 2000) o la longevidad (Ashrafi et al., 2000). Posteriormente se describió otro gen (SNF4) cuyo mutante presentaba un fenotipo similar al de *snf1* (Schuller and Entian, 1988) y carecía de actividad quinasa SNF1 *in vitro*. Más tarde se descubrió que formaban parte del mismo complejo y que, SNF4 era capaz de regular la actividad catalítica de SNF1 a través de su interacción (Celenza and Carlson, 1989). Mediante ensayos de doble híbrido se identificó una familia de proteínas que se denominaron Sip1, Sip2 y Gal83 (o subunidades β), con capacidad para interactuar con SNF1 y SNF4 (Yang et al., 1992), lo cual permitió establecer un modelo de complejo heterotrimérico en el que estas subunidades actuarían de puente (Jiang and Carlson, 1996). Se determinaron dos dominios conservados en la familia de proteínas Sip1/Sip2/Gal 83: el dominio KIS (Kinase Interacting Sequence), responsable de la unión a la subunidad quinasa y el dominio ASC (Association with the SNF1 Complex) responsable de la unión a la subunidad reguladora. El modelo propuesto (figura 5), indica que la subunidad SNF4 compite con el dominio quinasa de SNF1 (región N-terminal), en la unión con su dominio C-terminal (dominio regulador y autoinhibidor), en función de la disponibilidad de glucosa, y modula de esta manera su actividad (Jiang and Carlson, 1997). Las subunidades β son necesarias para la actividad SNF1 *in vivo* y

determinan la especificidad de sustrato (Schmidt and McCartney, 2000) y la localización subcelular de SNF1 en función de la fuente de carbono disponible (Vincent et al., 2001).

Así, los primeros estudios referentes a la estructura y composición del complejo se obtuvieron en levadura y se confirmaron más adelante con la purificación del complejo heterotrimérico de mamíferos (Davies et al., 1994; Mitchelhill et al., 1994; Woods et al., 1996). A pesar de que proteínas homólogas a la subunidad catalítica ya habían sido descritas en varias especies vegetales (Alderson et al., 1991; Le Guen et al., 1992; Muranaka et al., 1994; Hannapel et al., 1995; Bhalerao et al., 1999) la información referente a la existencia de estos complejos se obtuvo con la identificación de subunidades homólogas a SNF4 y Sip/Gal83, mediante estudios de doble híbrido (Bouly et al., 1999; Lakatos et al., 1999) e inmunoprecipitaciones (Ferrando et al., 2001)

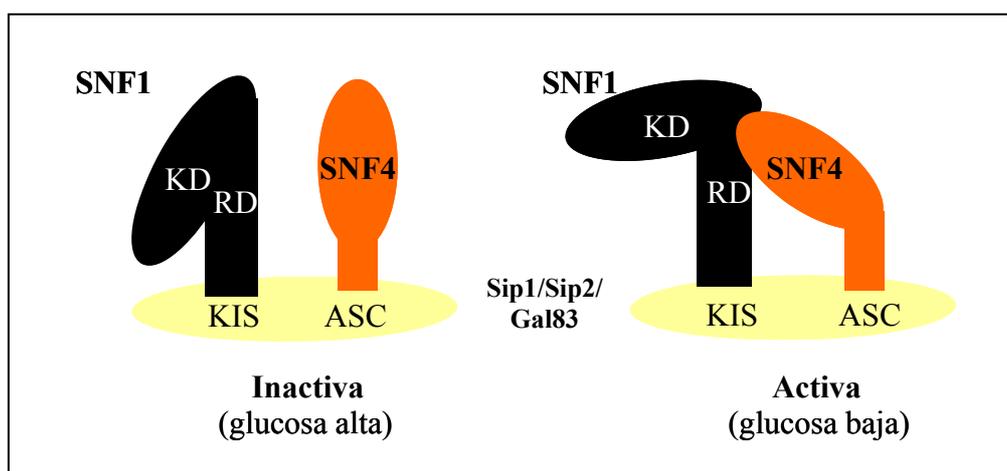


Figura 5. Modelo del complejo heterotrimérico e interacción entre subunidades en levadura, según Jiang and Carlson (1996). El complejo contiene SNF1, SNF4 y una de las subunidades Sip1, Sip2, Gal83. Cada una de ellas interactúa independientemente con SNF1 y SNF4 a través de los dominios KIS y ASC, respectivamente. En condiciones en que las células tienen suficiente glucosa en el medio, el dominio regulador de SNF1 (RD) está unido al dominio quinasa (KD), causando la autoinhibición de la actividad quinasa; cuando la glucosa es limitante, SNF4 interactúa con el dominio regulador de SNF1 permitiendo su liberación del dominio quinasa y proporcionando así una forma activa de SNF1. Interacciones adicionales no se excluyen y es posible que ASC interactúe también con SNF1. Este modelo no incluye otros componentes que pueden formar parte del complejo, pero no los descarta.

Paradójicamente, la nomenclatura no conserva ningún tipo de similitud entre los diferentes organismos estudiados y resulta a veces confusa. En mamíferos, el complejo se ha denominado AMPK (AMP-activated protein kinase) debido a su activación alostérica por AMP, y las subunidades homólogas a SNF1, SNF4 y Sip1/Sip2/Gal83 reciben el nombre de AMPK α , AMPK β y AMPK γ , respectivamente. En plantas no se

ha establecido un consenso común y se utiliza tanto la nomenclatura β/γ como la de SNF1/SNF4/Sip-Gal83. Para facilitar la comprensión, en este trabajo utilizaremos la nomenclatura de mamíferos (α,β,γ).

Las diferentes subunidades catalíticas descritas en organismos de los tres reinos presentan una identidad de secuencia cercana al 48% si se compara toda la proteína y entre un 60-65% si se restringe al dominio quinasa (Polge and Thomas, 2007). A pesar de que existen diferencias en su regulación, como se describe en el apartado 2.2, conservan características comunes como la necesidad de fosforilación de una treonina conservada (T210 en *S cerevisiae*, T172 en *H sapiens*, T175 en *A.thaliana*). La evolución ha dotado a plantas y animales de más de una subunidad catalítica, para probablemente ejercer así, un mayor número de funciones y permitir una regulación más fina y compleja del metabolismo celular. En humanos por ejemplo, existen dos subunidades catalíticas: AMPK α 1 y AMPK α 2, que se distinguen en su afinidad por sustratos (Woods et al.,1996), su localización subcelular (Salt et al., 1998) y se activan en diferentes situaciones (Nakano et al., 2006). En plantas también existen diferentes genes para las subunidades catalíticas, (AKIN10, AKIN11 y AKIN12 en *A. thaliana*, aunque éste último parece ser un pseudogen)(Bouly et al., 1999; Bhalerao et al., 1999). Además, en el caso de cereales esta familia se divide en dos subgrupos (SnRK1a y SnRK1b) en función de su similitud de secuencia y patrón de expresión. SnRK1a es la más similar a su homóloga presente en dicotiledóneas y se expresa en toda la planta, mientras que, SnRK1b es exclusiva de cereales y se expresa principalmente en la semilla (Halford et al, 2003).

Desde mitad de los años 90, se han identificado diferentes genes codificantes para las subunidades β y γ . Estudios de inmunoprecipitaciones con las diferentes subunidades, purificación del complejo o doble híbrido apoyaban hasta hace muy poco la conservación del complejo heterotrimérico propuesto en levaduras, para plantas y mamíferos. Sólo un par de trabajos (Mitchelhill et al., 1994; Wilson et al., 1996) sugerían la existencia de complejos activos en levadura formados únicamente por las subunidades SNF1/SNF4. La formación de un complejo dimérico activo es, sin embargo, contrario a los datos genéticos, que indican la necesidad de al menos una subunidad β para la actividad SNF1. Este hipotético complejo heterodimérico no se ha observado en purificaciones más recientes del complejo mediante otros métodos (Elbing et al., 2006).

2.1.2 Subunidades atípicas y nuevos modelos de complejo

Los primeros datos que sugirieron la formación de un posible complejo diferente a lo que se había descrito hasta el momento, surgieron a partir de un trabajo realizado en nuestro laboratorio cuando se identificó en maíz, un tipo de subunidad con una organización de dominios diferente a lo que se había descrito hasta el momento (Lumbreras et al., 2001). Esta nueva subunidad, se denominó ZmAKIN $\beta\gamma$ porque presenta un dominio KIS N-terminal, característico hasta entonces de las subunidades β , fusionado a un dominio del tipo de las subunidades γ . ZmAKIN $\beta\gamma$ complementa al mutante $\Delta snf4$ de levadura, y muestra una interacción con AKIN11 (subunidad catalítica de *A. thaliana*) dependiente de glucosa. Con estos datos se propuso un modelo dimérico formado por una subunidad catalítica y la subunidad AKIN $\beta\gamma$. Este tipo de subunidades quiméricas se han descrito en otras especies vegetales como *A. thaliana* o *M. truncatula* (Buintik et al., 2003). Posteriormente, se describió una proteína tirosina/treonina fosfatasa (dsPTP) con un dominio homólogo a KIS en su extremo C-terminal (Fordham-Skelton et al., 2002), añadiéndose así, un nuevo componente regulador a este complejo. El hecho que no existan subunidades del tipo $\beta\gamma$, ni PTP-KIS, en organismos cuyo genoma ha sido secuenciado, como *D. Melanogaster*, *S. cerevisiae* o *H sapiens*, indica la exclusividad de estas subunidades en especies del reino vegetal.

Éstos no son los únicos casos de subunidades atípicas en plantas. Gissot et al., describieron en el 2003 una subunidad β de *A. thaliana* (AKIN $\beta3$) que carecía de parte del dominio KIS. Previamente se habían descrito dos subunidades de *A. thaliana* con los dominios conservados (AtAKIN $\beta1$ y AtAKIN $\beta2$). La estructura de las subunidades β se caracteriza, como ya se ha comentado, por la presencia de los dominios KIS (N-terminal) y ASC (C-terminal), siendo el extremo N-terminal (sin incluir el dominio KIS) el más divergente entre diferentes subunidades β . Recientemente, se ha descrito que estas subunidades contienen un dominio que solapa con el dominio KIS y que presenta las características de un dominio N-isoamilasa (Hudson et al., 2003). Este dominio se ha denominado también GBD (Glycogen Binding Domain) porque en algunos casos, como el de la subunidad AMPK $\beta1$ de humanos, es capaz de unir glucógeno (Polekhina et al., 2003). Estudios bioinformáticos han identificado en plantas diversas proteínas con el dominio KIS y han estudiado la conservación de su capacidad para unir almidón, carbohidrato de reserva en células vegetales, equiparable al glucógeno de las células animales, (Fordham-Skelton et al., 2002, Kerck et al., 2006).

En la figura 6 se representan las proteínas codificantes de las ESTs encontradas en estos estudios y se indican aquellas que son exclusivas de plantas.

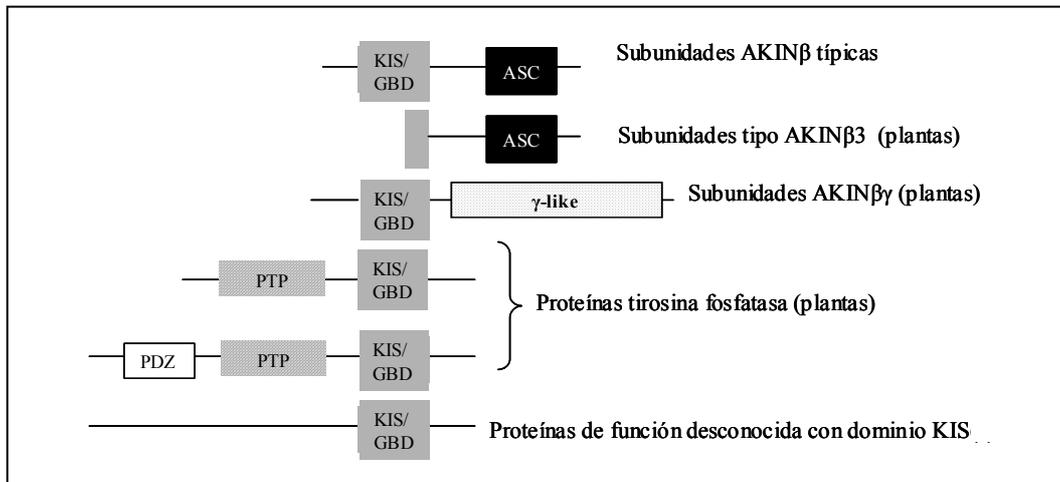


Figura 6. Representación de proteínas vegetales que contienen el dominio KIS. Entre ellas están: las subunidades AKIN β clásicas, con los dominios KIS y ASC conservados; las subunidades tipo AKIN β 3 carecen de parte del dominio KIS, y totalmente del putativo dominio de unión a glucógeno (o almidón); dos proteínas fosfatasas, una de ellas con un dominio adicional de unión a proteínas (PDZ); otras proteínas con el dominio KIS pero sin otro dominio funcional conocido y filogenéticamente cercanas a PTP.

Estudios de doble híbrido y *pull down* con AKIN β 3 han demostrado que esta subunidad atípica conserva la capacidad para interactuar con la subunidad catalítica AKIN11 y, sorprendentemente, también con la subunidad AKIN β γ , pero no con AKIN β 1/ β 2 o AKIN γ (Gissot et al., 2004; Gissot et al., 2006). A partir de estos estudios, Polge and Thomas (2007) han sugerido la existencia en plantas, de complejos con una composición distinta a la clásica. En la figura 7 se muestran estas nuevas composiciones junto con la propuesta por nuestro grupo.

La familia de subunidades γ también se ha ampliado y ha divergido en vegetales, no sólo en su composición, sino probablemente también en su funcionalidad ya que algunas de ellas han perdido la capacidad para complementar a *Δsnf4* (Bouly et al., 1999; Slocombe et al., 2002). Resultados obtenidos en plantas, mamíferos y levadura han demostrado la presencia, en la familia SNF4/AMPK γ /SnRK γ , de cuatro motivos CBS en tándem, formando lo que se ha denominado dominios Bateman (Bateman, 1997). En mamíferos se ha descrito que estos dominios representan los lugares de unión a AMP y ATP de AMPK (Kemp et al., 2004; Scott et al., 2004).

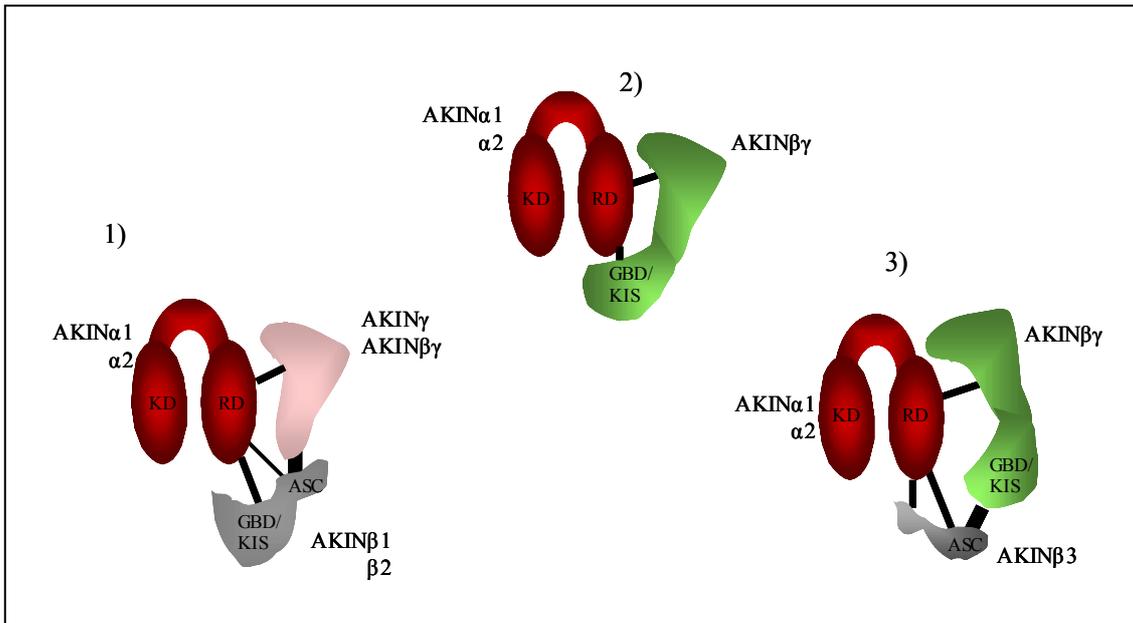


Figura 7. Esquema de los posibles complejos SnRK1 en plantas en función de la existencia de diferentes subunidades y la afinidad de interacción entre ellas. Dependiendo de qué subunidad β esté involucrada en el complejo, la importancia del dominio KIS o ASC en la fijación de la subunidad quinasa varía. El grosor de las líneas indica la fuerza de la interacción.

Filogenéticamente, las subunidades γ de plantas aparecen separadas de otros organismos y se dividen en tres subgrupos como se observa en la figura 8 (Gissot et al., 2006).

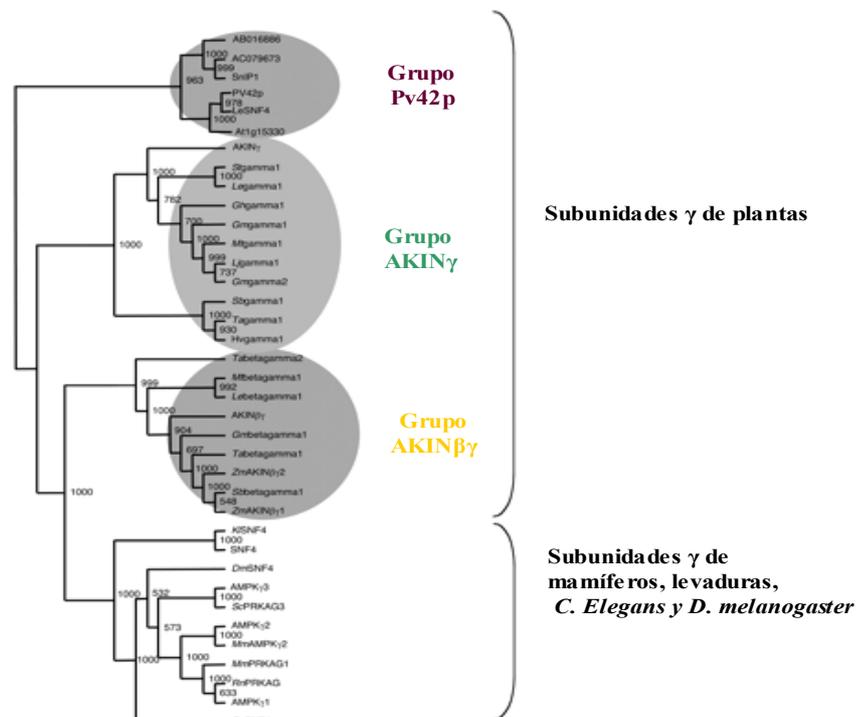


Figura 8. Análisis filogenético de subunidades γ de diferentes organismos, según Gissot et al., (2006)

A pesar de su única organización de dominios, las subunidades atípicas AKIN β γ son las más cercanas al grupo formado por subunidades γ de especies no vegetales.

Paralelamente a la información obtenida en plantas sobre nuevas combinaciones de subunidades, también en humanos han surgido estudios que descartan, al menos para AMPK, el modelo trimérico propuesto por Jiang and Carlson (1996). Varios estudios recientes han demostrado que el dominio KIS no es necesario para la unión de la subunidad catalítica, como había sido establecido anteriormente. El primer dato que apoya esta hipótesis surge al observarse, que subunidades AMPK β con el dominio KIS deletado, son capaces de inmunoprecipitar el complejo activo (Hudson et al., 2003). Es a partir de este trabajo, cuando se propone cambiar el nombre KIS (Kinase Interacting Sequence) por GBD (Glycogen Binding Domain), ya que por otra parte, se comprueba que este dominio es necesario para dirigir el complejo a cuerpos de almacenamiento de glucógeno. Más recientemente, otro trabajo confirma mediante sobreexpresión e inmunoprecipitación de subunidades, que el dominio KIS no es necesario para la asociación de las subunidades AMPK α y AMPK γ (Iseli et al., 2005). Un nuevo estudio, mediante aproximaciones similares, propone un modelo alternativo en el que el dominio KIS, no sólo no es necesario para la asociación con la subunidad catalítica, sino que además descarta la función de las subunidades β como mediadoras entre AMPK α y AMPK γ (Wong et al., 2006) (figura 9).

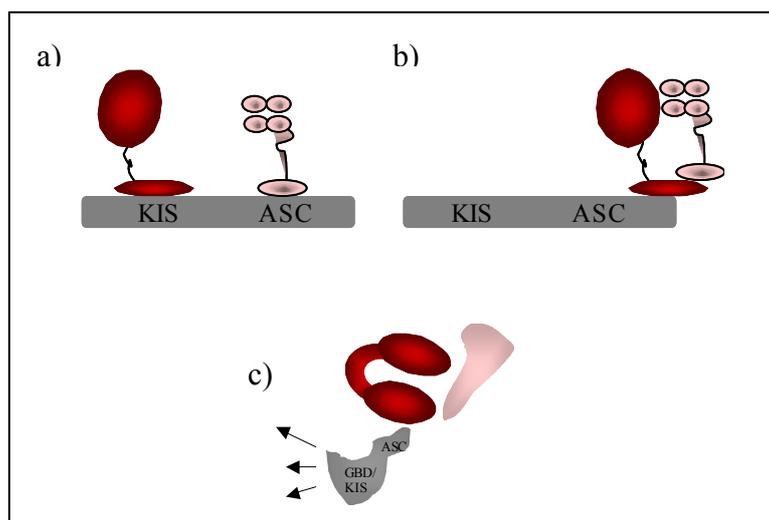


Figura 9. Comparación del modelo de levadura (a) propuesto por Jiang and Carlson (1996) y el modelo alternativo de humanos (b) propuesto por Wong et al. (2006). En (c) se muestra este último modelo con el mismo formato de subunidades utilizado en la figura anterior. Las flechas indican posibles funciones que podría ejercer AMPK a través del dominio KIS, que queda libre en este modelo.

El nuevo modelo sugiere que la subunidad γ interacciona directamente con la subunidad α , a través del dominio quinasa y del dominio regulador. Los mismos autores que proponen este modelo, especulan sobre la formación de complejos con una estequiometría diferente a la clásica 1:1:1 y mencionan, el posible complejo dimérico de levadura que ya habían descrito Mitchelhill et al., (1994), o el que surge a partir de la estructura cristalina de SNF1 (Nayak et al., 2006) y que se comenta en el siguiente apartado.

Todos estos trabajos son un reflejo de la complejidad y la flexibilidad de los componentes y las interacciones de este complejo en los diferentes organismos.

2.1.3 Estructura del complejo: cristalización de diferentes dominios.

La resolución de la estructura tridimensional de este complejo es sin duda necesaria para demostrar la naturaleza de las interacciones entre subunidades. Debido a la importancia que AMPK tiene en enfermedades metabólicas como la diabetes de tipo II, el conocimiento de esta estructura es especialmente interesante para el diseño racional de fármacos capaces de modular su función. Actualmente, el descubrimiento de nuevos fármacos se basa en la estructura de la diana en lugar de tomar como referencia la estructura de otros ligandos, tal y como se hacía en el pasado (López Pérez y col., 2005). AMPK es la diana de una de las drogas utilizadas para el tratamiento de la diabetes II, la metformina.

Los primeros datos de estructura que se han obtenido, han sido los del dominio GBD de la subunidad AMPK β de humanos (Polekhina et al., 2003; Polekhina et al., 2005). Además de unir glucógeno, se ha demostrado que este dominio es responsable de la interacción de AMPK con un enzima desramificador de glucógeno, capaz de inhibir la actividad AMPK *in vivo* (Sakoda et al., 2005). El conocimiento de esta estructura es de gran relevancia para el diseño de fármacos ya que, moléculas capaces de inhibir esta interacción, evitarían la interacción de AMPK con glucógeno y así, aumentarían la actividad AMPK. El dominio GBD ha sido cristalizado formando un complejo con β -ciclodextrina, molécula utilizada en estudios previos como análoga a glucógeno y almidón. La determinación de su estructura ha revelado que el dominio de unión a carbohidratos de AMPK β , es similar al que poseen otras enzimas como la β -amilasa, o la glicosiltransferasa, y determina que son cinco los residuos de glucosa asociados con

la estructura en bolsillo del dominio de unión a glucógeno. En este mismo trabajo se comparan, los residuos involucrados en la unión a glucógeno de las subunidades β de animales, con las de plantas. Cambios en residuos importantes podrían indicar que la unión se produce con moléculas más pequeñas como la sacarosa o la trehalosa. Según esta comparación, una doble inserción aminoacídica en las subunidades AMPK β de *A. thaliana*, resultaría en un sitio de unión más estrecho, idóneo para una molécula menos voluminosa que el glucógeno, como el almidón.

Por otra parte, dos estudios independientes han descrito casi al mismo tiempo la estructura cristalina del dominio quinasa de SNF1 con una resolución de 2.2 y 2.8 Å (Rudolph et al., 2005; Nayak et al., 2006) (figura 10). En ambos estudios, este dominio quinasa aparece como un homodímero que según Nayak et al., también se forma en solución e *in vivo*, con la proteína entera. El dominio quinasa de SNF1 adopta una estructura bilobular, típica de todas las quinasas. El sitio activo, que contiene el lugar de unión a ATP y el segmento de activación que incluye la Thr fosforilable, está localizado en un surco formado entre los dos lóbulos. Las dos subunidades del dímero cristalizado se encuentran formando un ángulo de 45°C, con el lóbulo N- terminal de una subunidad próximo al lóbulo C-terminal de la otra subunidad. Una de las características importantes de esta estructura cristalina es que la Thr210 está en un surco inaccesible a proteínas quinasas activadoras. Además, la modelización de la unión de ATP y un sustrato peptídico a SNF1, en función del modelo de CDK2, sugiere que la formación del dímero no es compatible con la unión del sustrato. A partir de estas observaciones, los autores proponen un modelo con un nuevo mecanismo de regulación, que implica la disrupción del dímero para la formación de un complejo heterotrimérico activo, y la fosforilación de la Thr210. El elevado grado de conservación de secuencia entre el dominio quinasa de diferentes organismos, sugiere que su estructura será también similar y, por tanto, podrían seguir el modelo descrito en levaduras.

También el segundo dominio Bateman de la subunidad SNF4 ha sido cristalizado más recientemente, con una resolución de 1.9 Å. Este estudio ha confirmado la interacción entre dos dominios CBS, así como la formación de un bolsillo central donde se encuentran localizadas la mayoría de mutaciones que se han descrito como causantes de alteraciones metabólicas (Rudolph et al., 2007). Como en el caso del dominio quinasa de la subunidad catalítica SNF1, este dominio también se presenta en forma de dímeros, que se forman también con la proteína entera.

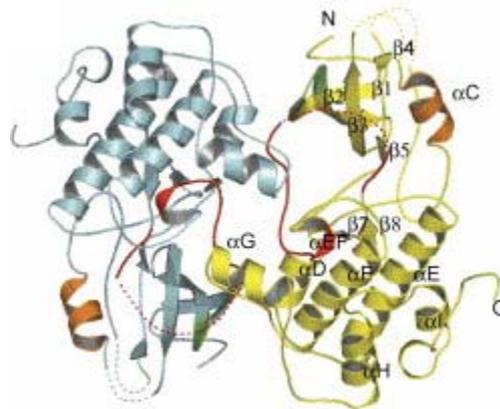


Figura 10. Estructura del dominio quinasa de SNF1 de levadura. Los dos protómeros se muestran en amarillo y azul. El loop de unión a ATP se muestra en verde, la hélice C-terminal en naranja y el segmento de activación T-loop en rojo. Las líneas punteadas indican zonas de estructura desordenada. (Nayak et al., 2006)

2.2 Mecanismos de modulación de la actividad de SNF1/AMPK/SnRK1

La conservación de esta familia de quinasas a lo largo de la evolución se extiende también en parte, a su mecanismo de regulación postraducciona, y en consecuencia, a la modulación de su actividad. Una de las características comunes en todos los organismos es la necesidad de la fosforilación de la subunidad catalítica en una Thr conservada del loop de activación, para su funcionalidad. La identificación de tres quinasas (Elm1, Pak1, Tos3) activadoras de SNF1 en levadura (Hong et al., 2003; Sutherland et al., 2003), permitió posteriormente la identificación en humanos de la proteína quinasa LKB1 (Woods et al., 2003), estudiada por su implicación en un tipo específico de cáncer, como una de las quinasas activadoras de AMPK (AMPKK). Más recientemente también se les ha atribuido esta función activadora a las proteínas CaMKK (Hurley et al., 2005) y a la proteína Tak1 (Momcilovic et al., 2006). En plantas, se han identificado dos proteínas de *A. thaliana* capaces de complementar al triple mutante $\Delta elm1, sak1, tos3$ de levadura, que presenta un fenotipo similar al de $\Delta snf1$ (Hey et al., 2007). Estas proteínas se han denominado AtSnAK1 y AtSnAK2 (*Arabidopsis thaliana* SnRK1-activating Kinase) y se ha demostrado que son capaces de fosforilar un péptido del segmento de activación de SnRK1 que contiene la Thr fosforilable.

La modificación postraducciona de las subunidades β de mamíferos, por meristilación y fosforilación, es otro mecanismo de regulación ya que afecta a la

localización subcelular y a la actividad enzimática (Warden et al., 2001). Hardie et al. (2003) sugieren que la localización de AMPK asociada a gránulos de almidón puede ser un mecanismo de percepción de los niveles de glucógeno en la célula y postulan la existencia de un complejo macromolecular donde una comunidad de enzimas reguladores críticos está asociada a las partículas de glucógeno. En el caso de levaduras, las subunidades Sip/Gal83 ejercen un papel similar al determinar la localización subcelular de SNF1 en función de la fuente de carbono disponible (Hedbacker and Carlson, 2006) y así regular indirectamente su función. Desafortunadamente, hasta ahora no hay datos de la regulación postraduccional de las subunidades SnRK1, exceptuando la T175 de la subunidad catalítica, ni de su distribución subcelular.

Diferentes situaciones de estrés comprometen el estado energético de la célula, reflejándose en un incremento del ratio AMP/ATP. En el caso de mamíferos, el metabolito AMP es la señal que inicia la activación de la proteína AMPK, provocando, a través de diferentes mecanismos, un cambio en el metabolismo celular, “apagando” vías biosintéticas y “encendiendo” vías catabólicas capaces de recuperar las reservas energéticas. Por su acción en el metabolismo, dependiendo de la carga energética, AMPK ha sido definida como *indicador del combustible celular* (Hardie and Carling, 1997). A diferencia de los sistemas de plantas y levadura, en mamíferos se conoce que el metabolito que inicia la señal de activación de AMPK es el AMP. Este metabolito actúa modulando alostéricamente la actividad AMPK e inhibiendo la defosforilación de la T172 pero no incrementa la actividad de las AMPKKs (figura 11), a diferencia de lo que se creía hasta hace muy poco (Sanders et al., 2006; Suter et al., 2006).

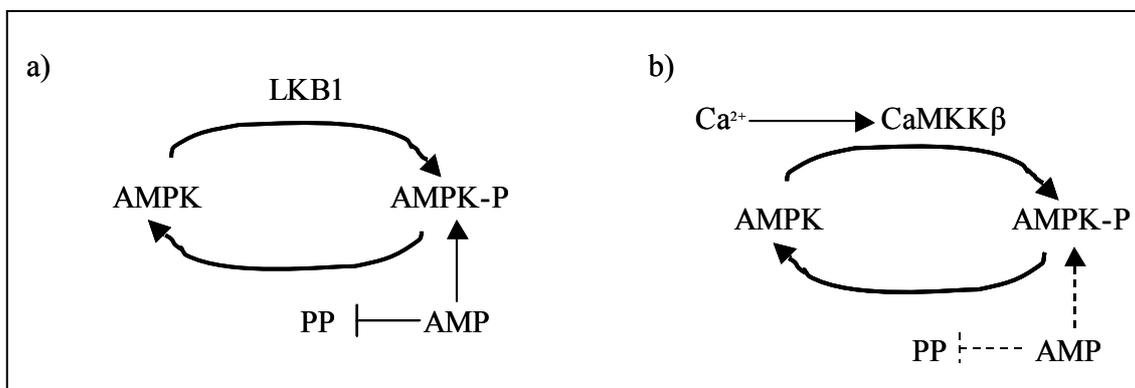


Figura 11. Modelo de regulación de AMPK por AMP: **a)** Condiciones que incrementan [AMP] provocan la inhibición de la defosforilación de AMPK. La actividad LKB1 es constitutiva por lo que la inhibición de la defosforilación provoca un incremento en la fosforilación de la T172; por otra parte, AMP activa alostéricamente a AMPK; **b)** Las condiciones que incrementan [Ca²⁺] activan CaMKKβ, incrementando la fosforilación y la actividad de AMPK, sin necesidad de un incremento en [AMP]. Es posible que en

algunas situaciones $[Ca^{2+}]$ y $[AMP]$ aumenten en paralelo y AMP active alostéricamente a AMPK e inhiba su defosforilación (flechas punteadas). (Modelo de Sanders et al., 2006)

En levaduras y plantas, el AMP no es un modulador enzimático de SNF1, sin embargo, en ambos organismos mantiene cierta relación con el complejo. En levadura, SNF1 se activa en condiciones en las que hay un aumento en la ratio AMP/AMPK (Wilson et al., 1996). En plantas, aunque no es capaz de modular alostéricamente a SnRK1, evita su inactivación a través de la inhibición de fosfatasa (Douglas et al., 1997; Sudgen et al., 1999).

La interacción con proteínas es otro de los mecanismos de regulación de la actividad (Halford et al., 2003). En mamíferos se ha descrito como la subunidad AMPK γ puede modificar la actividad AMPK α a través de su interacción y dependiendo de la presencia de AMP (Scott et al., 2007). En levaduras, se conoce que SNF4 es necesaria para la activación de SNF1, pero se desconoce el mecanismo por el que se produce. En plantas se han descrito otras proteínas capaces de modular la actividad SnRK1. PRL1 es una proteína nuclear con una serie de dominios WD40 que interacciona con AKIN α , inhibiendo su actividad (Bhalerao et al., 1999). Las proteínas de geminivirus AL2 y L2 interaccionan e inactivan a SnRK1 de tabaco (Hao et al., 2003).

El sistema vegetal mantiene diferencias destacables por lo que se refiere a regulación, ya que es el único sistema donde se ha detectado la activación de SnRK1 en presencia de sacarosa (Purcell et al., 1998; Tiessen et al., 2003). De manera opuesta, la glucosa-6-P se ha descrito que es capaz de inhibir *in vitro* la actividad SnRK1 (Toroer et al., 2000). La activación constitutiva de la subunidad SNRK1 de tabaco, NPK5, cuando se sobreexpresa en levadura, es también un indicador de las diferencias en la regulación entre estos dos sistemas (Muranaka et al., 1994).

La presencia de varios genes para cada subunidad, combinado con la expresión diferencial y la existencia de *splicing* alternativo, resulta en la formación de diferentes complejos, que podrían ser regulados en función de la necesidad del organismo, según el tejido y las condiciones fisiológicas y/o ambientales. De esta manera, la regulación transcripcional de las diferentes subunidades, puede ser también un modo de regular la actividad SnRK1. En plantas, igual que ocurre en mamíferos (Stapleton et al., 1996), las diferentes subunidades presentan un patrón de expresión diferencial a lo largo del desarrollo, según la presencia de fitohormonas y ante diferentes tratamientos de estrés. Las subunidades catalíticas de arroz OSK1 y OSK4, pertenecientes al grupo SnRK1a y

SnRK1b respectivamente, se expresan de manera diferencial durante el desarrollo de la semilla (Takano et al., 1998). En un análisis de *microarrays* sobre la respuesta de la planta a trehalosa se ha observado el incremento de expresión de AKIN11, subunidad catalítica de *A. thaliana*, junto con el de otros genes involucrados en vías de estrés (Schluepman et al., 2003). Estudios detallados de la regulación génica de las diferentes subunidades SnRK1, durante el desarrollo y ante situaciones de estrés, se han realizado en semillas de tomate y alfalfa (Bradford et al., 2003; Buitink et al., 2004). Estos trabajos han implicado a las subunidades β , γ y $\beta\gamma$ en varias situaciones de estrés. Un ejemplo es el incremento del transcrito de MtAKIN $\beta\gamma$ durante el proceso de adquisición de la tolerancia a la desecación. Por otro lado, la expresión de las subunidades AKIN β 1 se incrementa en condiciones de privación de azúcares, u oscuridad (Buintik et al., 2004; Bouly et al., 1999). El mecanismo de *splicing* alternativo se ha descrito para la subunidad AtAKIN $\beta\gamma$ (Gissot et al., 2006) y los dos transcritos identificados se expresan de manera tejida específica.

En resumen, esta regulación de SnRK1 a través de los mecanismos citados, resulta en un mecanismo complejo, dinámico y rigurosamente regulado que le permite integrar y responder a diferentes vías de señalización.

2.3 SNF1/AMPK/SnRK1 en el control del metabolismo y otras funciones

2.3.1 SNF1, de la fermentación a la respiración

En levaduras SNF1 juega un papel clave en la transición del metabolismo fermentativo al metabolismo oxidativo. Durante este fenómeno la expresión de una cuarta parte del genoma (2126 genes) se modifica (DeRisi et al., 1997). De estos genes, 430 son dependientes de SNF1 y codifican para proteínas involucradas en procesos de transcripción, señalización, metabolismo de carbohidratos y respiración (Young et al., 2003). Sólo algunos de los mecanismos por los cuales SNF1 es capaz de provocar esta masiva activación génica han sido descritos y se han mencionado en el apartado 1.1.

2.3.2 AMPK, control del metabolismo global del organismo

El complejo AMPK parece haber evolucionado también en cuanto a función en organismos pluricelulares, permitiéndole la capacidad de integrar diferentes señales y

controlar el metabolismo, no sólo a nivel celular, sino de todo el organismo. Este papel está claro en humanos, donde se conoce que AMPK se activa ante situaciones metabólicas de estrés celular como privación de glucosa, isquemia, hipoxia, ejercicio o contracción muscular, pero también por hormonas y citoquinas. Un ejemplo del control de AMPK a nivel de organismo, es la activación del complejo por leptina en músculo esquelético (Minokoshi et al., 2002) y por leptina y adiponectina en músculo esquelético e hígado (Tomas et al., 2002; Yamauchi et al., 2002). El resultado en músculo es un mayor gasto energético, a través del incremento en la oxidación de ácidos grasos y la biogénesis de mitocondrias. De manera inversa, la leptina, igual que la glucosa y la insulina, inhibe a AMPK en el hipotálamo y provoca una reducción en la ingesta calórica (Minokoshi et al., 2004). A nivel celular AMPK se ha implicado en múltiples procesos que incluyen: la regulación transcripcional, la regulación de la síntesis proteica, y la regulación postraduccional de múltiples enzimas (Rutter et al., 2003)

2.3.3 SnRK1, ¿control del metabolismo global en plantas?

La información disponible sobre la función de SnRK1 es mucho menor que la existente para el complejo de mamíferos y levadura, pero existen evidencias importantes de que juega un papel similar en la regulación del metabolismo del carbono, así como en procesos de desarrollo y adaptación a estrés.

SnRK1 en la regulación del metabolismo

SnRK1 fosforila e inactiva enzimas metabólicas importantes como: HMG-CoA reductasa (síntesis de isoprenoides) (Dale et al., 1995), sacarosa fosfato sintasa (biosíntesis de sacarosa) y nitrato reductasa (primer paso en la asimilación de nitrógeno para generar aminoácidos)(Sudgen et al., 1999b). Todos ellos están involucrados en vías biosintéticas y la fosforilación por SnRK1, inhibe su actividad. Recientemente se ha demostrado que SnRK1 altera la actividad de HMG-CoA reductasa *in vivo* al sobreexpresar en patata una forma de la enzima con el consenso de fosforilación SnRK1 mutado (Hey et al., 2006).

Diferentes estudios han descrito que SnRK1 participa en la biosíntesis de carbohidratos mediante diferentes mecanismos. SnRK1 modula la actividad ADP-glucosa pirofosforilasa, enzima clave en la biosíntesis del almidón, a través de su

activación redox en respuesta a altas concentraciones de sacarosa (Tiessen et al., 2003). Estudios con un doble mutante de *snf1* en el musgo *Physcomitrella patens* reflejan claros defectos en la acumulación de almidón (Thelander et al., 2004). Este mutante es incapaz de crecer en condiciones diferentes a luz continua, situación similar a la de privación por glucosa en los organismos estudiados. Similarmente, plantas transgénicas de guisante con el antisentido de SnRK1 muestran una relación de carbono/ nitrógeno más alta que las plantas salvajes (Radchuck et al., 2006). Estas plantas de guisante presentan además alteraciones fenotípicas (defectos en maduración, contenido bajo en globulinas, y niveles de sacarosa elevados) que sugieren que el complejo podría estar implicado en la coordinación de la división y expansión celular, procesos en que están implicados los azúcares.

A nivel transcripcional SnRK1 modula la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos. Así, la actividad SnRK1 es necesaria para la expresión en condiciones de sacarosa alta, de la sacarosa sintasa, enzima implicado en la degradación de sacarosa. La expresión de α -amilasa, enzima implicado en la degradación de almidón, requiere también la presencia/funcionalidad de SnRK1 (Laurie et al., 2003)

Implicación de SnRK1 en el desarrollo de la planta

La producción de plantas con niveles alterados de subunidades SnRK1 ha permitido demostrar, en diferentes especies vegetales, el papel del complejo SnRK1 durante el desarrollo. La expresión en cebada, en orientación antisentido, de la subunidad catalítica SnRK1, resulta en granos de polen pequeños, en forma de pera y con un contenido en almidón muy disminuido (Zhang et al., 2001). En otro organismo como patata, la expresión antisentido de la subunidad β GAL83, provoca raíces finas y pequeñas, con zonas meristemáticas y de elongación menores que en la planta salvaje, síntoma de un retraso en el desarrollo (Lovas et al., 2003). También el mutante *snf1* del musgo *Physcomitrella patens*, comentado anteriormente, presenta un fenotipo de senescencia avanzada y anormalidades en el desarrollo (Thelander et al., 2004).

Papel de SnRK1 en las respuestas a estrés

Las plantas transgénicas alteradas en la expresión de la subunidad GAL83 de patata, presentan un fenotipo de hipersensibilidad a sal, lo cual sugiere que el complejo SnRK1 activa mecanismos de protección frente al estrés salino. Este complejo también

se ha implicado en la respuesta de la defensa contra patógenos. La expresión de la secuencia sentido o antisentido de la subunidad catalítica SnRK1 de *Arabidopsis*, en tabaco, provoca resistencia o mayor sensibilidad, respectivamente, ante el ataque de geminivirus (Hao et al., 2003). Otra evidencia que sugiere la función del complejo SnRK1 en la respuesta a patógenos, es la interacción de la subunidad AKIN $\beta\gamma$ de *A.thaliana* con dos proteínas involucradas en la resistencia a nemátodos (Gissot et al, 2006).

Todos estos estudios apuntan claramente hacia un papel central de SnRK1, similar al de sus homólogos SNF1 y AMPK, en el control global del metabolismo celular. En la figura 12, se muestra un esquema de las funciones que SnRK1 ejerce en la planta. La identificación de componentes que interactúan con miembros del complejo SnRK1, el estudio de la distribución subcelular de subunidades y de los mecanismos por los que se regula la expresión génica, son esenciales para la comprensión de esta compleja red de señalización y respuesta en que se encuentra implicada SnRK1.

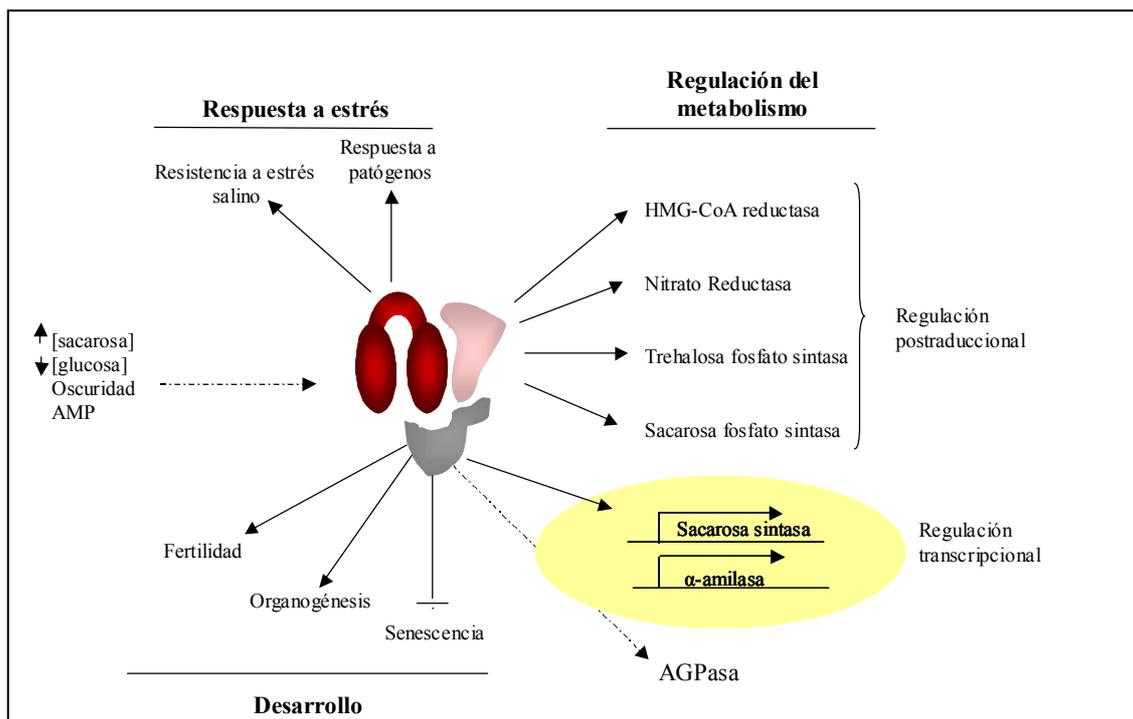


Figura 12. Esquema de las funciones atribuidas a SnRK1 en plantas. Este complejo actúa a través de la regulación postranscripcional y postraduccional. La alteración de la actividad SnRK1 provoca cambios en el metabolismo de carbohidratos, el desarrollo y la respuesta a estrés de la planta. Algunos metabolitos como la sacarosa, la glucosa o el AMP, directa o indirectamente, modulan la actividad SnRK1. Adaptado de Polge and Thomas, 2007

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

La identificación de la subunidad de maíz ZmAKIN $\beta\gamma$, llevó a proponer un nuevo modelo alternativo de complejo SnRK1, poniendo de manifiesto la diversidad y complejidad existente en plantas, respecto a esta familia de proteínas. Esta tesis doctoral tiene como objetivo principal la caracterización del complejo SnRK1 de maíz a través de la caracterización de la subunidad ZmAKIN $\beta\gamma$ y de la identificación de nuevas subunidades del complejo SnRK1. Los objetivos concretos que se plantearon al inicio de este trabajo son:

I. Caracterización de la subunidad ZmAKIN $\beta\gamma$:

- **Caracterización estructural de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$.** Esta parte se ha realizado en colaboración con el grupo del Dr. Ignacio Fita (IBMB-CSIC).

Como primera aproximación se decidió iniciar ensayos de cristalización del dominio KIS para posterior análisis por difracción de rayos X, uno de los procedimientos más habituales para la determinación de estructura. El conocimiento de la estructura de las subunidades del complejo SNF1/SnRK1 es de gran importancia para conocer como interaccionan entre ellas, o como son capaces de modular la actividad catalítica. El complejo AMPK/SNF1/SnRK1 es una importante diana terapéutica, por ello, la caracterización estructural de este complejo es una estrategia para el diseño de fármacos antidiabéticos. Debido a la similitud de secuencia y funcionalidad de estas subunidades entre diferentes organismos, es probable que la estructura esté también conservada.

- **Estudio del patrón de expresión y localización subcelular de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$.** Estudios previos demostraron que ZmAKIN $\beta\gamma$ se expresaba en los primeros estadios del desarrollo de la semilla y de manera constitutiva en plántula. Se decidió realizar un análisis más exhaustivo de los niveles de RNA y proteína en diferentes situaciones,

así como determinar su localización celular mediante fusión a la proteína GFP.

II. Identificación de componentes del complejo SnRK1

- **Identificación de nuevas subunidades del complejo SnRK1** Para la búsqueda de subunidades de maíz capaces de interactuar con ZmAKIN $\beta\gamma$ se realizaron diferentes aproximaciones como búsqueda en bases de datos, aislamiento por RT-PCR y análisis doble híbrido en levadura.
- **Análisis de interacciones entre subunidades.** Para el abordaje de la interacción AKIN $\beta\gamma$ con subunidades catalíticas de maíz se diseñaron experimentos de inmunoprecipitación. El estudio de las interacciones entre las subunidades aisladas se realizó mediante doble híbrido en levadura.

III. RESULTADOS

ANTECEDENTES

Mediante un rastreo de doble híbrido, utilizando como cebo la proteína de respuesta a ácido abscísico Rab 28, se aislaron dos genes, ZmAKIN β 1 y ZmAKIN β 2, con elevada identidad entre ellos (95%), y con homología a componentes del complejo SnRK1. La secuencia aminoacídica deducida para ZmAKIN β 1 y ZmAKIN β 2 reveló una organización de dominios única, según las subunidades caracterizadas hasta el momento de su identificación (Lumbreras et al., 2001). Este tipo de subunidades ZmAKIN β presentan en su extremo N-terminal un dominio KIS, característico de las subunidades β , fusionado a un dominio con similitud a las subunidades γ . Ensayos de complementación del mutante $\Delta snf4$ de levadura confirmaron la conservación funcional de ZmAKIN β 1/2, como subunidad reguladora del complejo SnRK1. A partir de este punto la caracterización funcional se llevó a cabo con la isoforma ZmAKIN β 1. En el mismo trabajo se demostró que ZmAKIN β interacciona por doble híbrido con la subunidad catalítica AKIN11 de *A.thaliana*, a través del dominio γ -like, y de manera dependiente de glucosa. Asimismo, estudios *in vitro* determinaron que el dominio KIS también es capaz de interactuar con la subunidad catalítica, lo cual llevó a proponer un modelo dimérico en plantas, alternativo al clásico complejo heterotrimérico descrito en mamíferos y levaduras (figura 13)

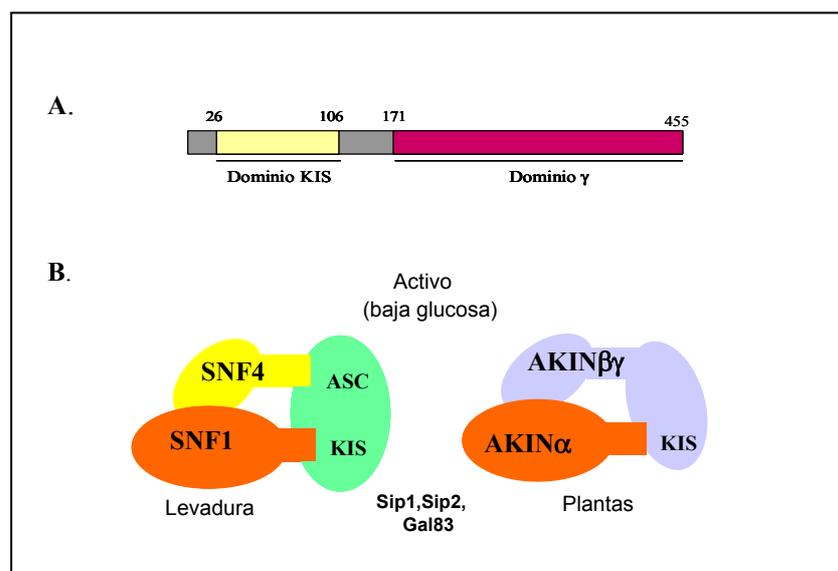


Figura 13. (A) Estructura general de la proteína ZmAKIN β γ, con los correspondientes dominios KIS y γ -like delimitados. (B) Comparación del modelo trimérico de levadura, propuesto por Jiang and Carlson (1997) y el modelo alternativo, exclusivo de plantas, propuesto por Lumbreras et al. (2001)

Capítulo I: Caracterización de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$

1.1 Caracterización estructural de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$

1.1.1 Sobreexpresión y purificación del dominio KIS

Las proteínas son los componentes macromoleculares más abundantes, por lo que no resulta sorprendente que las dianas más frecuentes de los fármacos sean enzimas, receptores unidos a membrana, canales iónicos o proteínas estructurales o transportadoras. En los últimos años, la resolución de la estructura tridimensional de proteínas diana, se ha convertido en una herramienta para el diseño de fármacos altamente específicos.

El complejo AMPK de mamíferos actúa en respuesta a condiciones de estrés celular tales como la contracción muscular o la hipoxia (Hardie et al., 2006). En músculo esquelético, la activación de AMPK comporta un aumento en la captación de glucosa, la sensibilidad a insulina y la oxidación de ácidos grasos. En el caso del hígado, la activación provoca un incremento en la oxidación de ácidos grasos y la inhibición en la producción de glucosa. Las dos principales drogas utilizadas en el tratamiento de la diabetes II, metformina y rosiglitazone, provocan un aumento de la actividad AMPK (Hardie and Sakamoto, 2006). Mutaciones en la subunidad $\gamma 2$ de humanos, son responsables del Síndrome Parkinson-White, caracterizado por arritmia, hipertrofia, y alteraciones en la acumulación de glucógeno en corazón (Davies et al., 2006). Todos estos efectos convierten a AMPK en una importante diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades como la diabetes de tipo II o la obesidad.

En el momento de iniciar este trabajo, los datos existentes apoyaban la existencia de un complejo dimérico en plantas en el que la subunidad AKIN $\beta\gamma$ se uniría a través del dominio KIS a la subunidad catalítica, provocando de esta manera, la activación del complejo. Por su única distribución de dominios, conocer la estructura de esta subunidad, es importante para profundizar en el mecanismo de activación de este complejo. Como primera aproximación se decidió utilizar el dominio KIS para realizar los primeros ensayos de cristalización, por su solubilidad frente a la proteína entera, que se acumula en cuerpos de inclusión en bacteria (figura 14b). La estrategia seguida de sobreexpresión y purificación se detalla en la figura 14 .

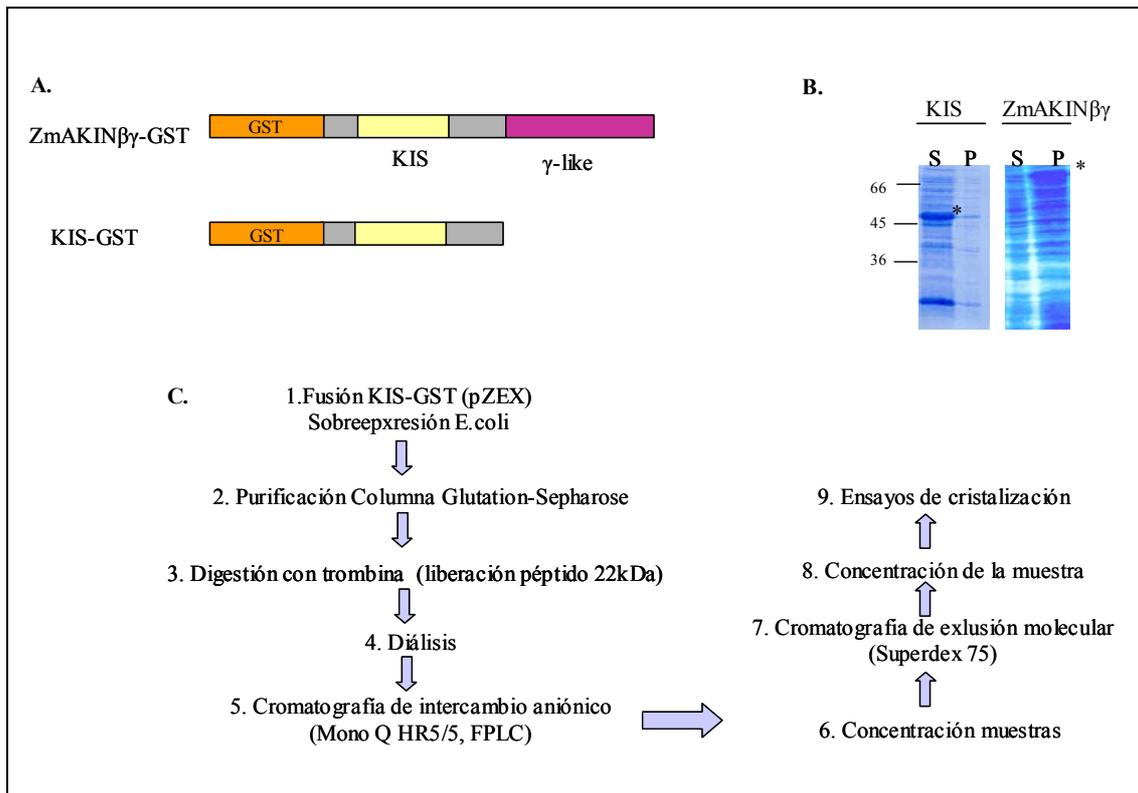


Figura 14. (A) Representación esquemática de las construcciones utilizadas para la sobreexpresión en E.coli. (B) Patrón de expresión de las proteínas, separadas por SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie, de los extractos totales (S, fracción soluble; P, fracción insoluble) después de la inducción. El asterisco indica la banda correspondiente a la proteína de fusión. (C) Pasos seguidos hasta la obtención de proteína purificada para realizar los primeros ensayos de cristalización.

La proteína quimérica GST-KIS se sobreexpresó en E.coli y se purificó por cromatografía de afinidad (Glutation Sepharose). Una vez unida la proteína a la columna se digirió con trombina, liberándose así un péptido con una masa molecular aparente de aproximadamente 22 kDa (figura 15)

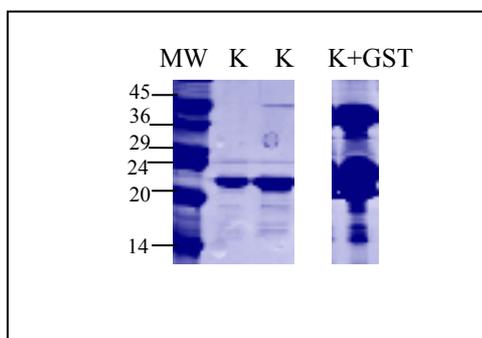


Figura 15. Electroforesis SDS-PAGE del dominio KIS ya digerido (K) y la proteína de fusión retenida en la resina (K+GST). MW: marcador de peso molecular.

Para comprobar la homogeneidad de la fracción purificada, la muestra se sometió a una segunda cromatografía, esta vez de intercambio aniónico, utilizando una columna MonoQ HR5/5 acoplada a un sistema FPLC. Para este segundo paso fue necesario dializar la proteína, ya que el tampón de digestión de trombina contiene una concentración de sal que no permite al dominio KIS unirse a la columna. Se detectaron dos picos de elución a diferentes concentraciones de sal (132 y 240 mM de NaCl), ambos correspondientes al péptido de 22 kDa. No se aprecian diferencias de tamaño cuando estas muestras se analizan en gel SDS-PAGE y se visualizan mediante tinción por Coomassie o plata

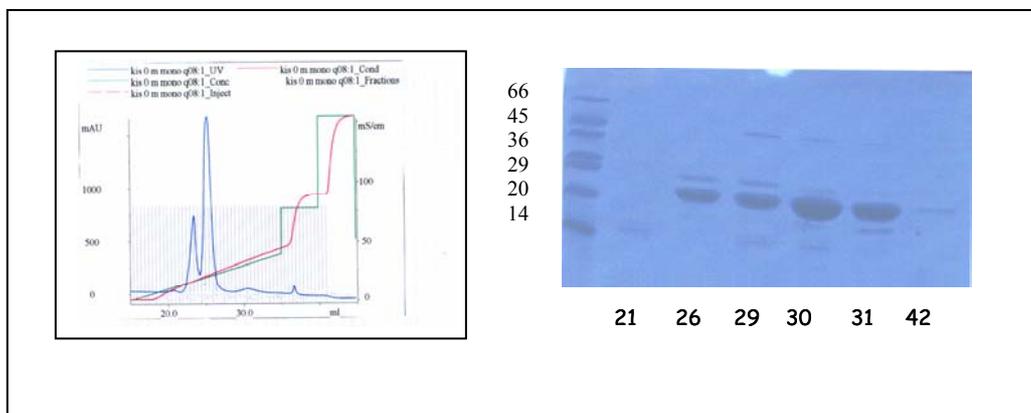


Figura 16. Purificación del dominio KIS mediante cromatografía de intercambio aniónico (Mono Q) y análisis de las fracciones en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. La fracción 26 corresponde al primer pico de elución (126 mM NaCl). Las fracciones 29-31 corresponden al segundo pico que eluye a 240 mM de NaCl)

Muestras correspondientes a los dos picos de la primera cromatografía se aplicaron por separado a la columna de intercambio aniónico. Así se quiso determinar si se trataba de muestras heterogéneas con diferentes conformaciones que no estuvieran en equilibrio y pudieran eluir tanto a la primera concentración de sal como a la segunda. Para favorecer las condiciones de cristalización es necesario partir de una muestra homogénea y estable. Mientras la muestra procedente del segundo pico eluía a 132 mM de sal, en un único pico, la muestra procedente del primer pico de elución volvía a comportarse igual que la muestra original, produciéndose de nuevo dos picos de elución. Estas muestras se sometieron a una tercera cromatografía, esta vez de exclusión molecular, con el fin de determinar si se trataba de conformaciones diferentes o bien de diferentes agregados proteicos. Se utilizó una columna Superdex 75, capaz de separar proteínas cuya masa se encuentra entre 3 y 75 kDa. Sorprendentemente, la muestra

procedente del primer pico volvía a comportarse como dos especies distintas, eluyendo en dos picos: el primero correspondiente a una proteína de masa molecular aproximada de 43 kDa y el segundo indicaba una masa de 20 kDa. La fracción correspondiente al segundo pico de elución de la columna Mono Q eluye al mismo tiempo que una proteína de aproximadamente 40 kDa (figura 17). Estos pesos coincidirían con la forma monomérica y dimérica de la proteína y se deduce que el dominio KIS, al menos *in vitro*, tiene tendencia a formar dímeros más estables que la forma monomérica.

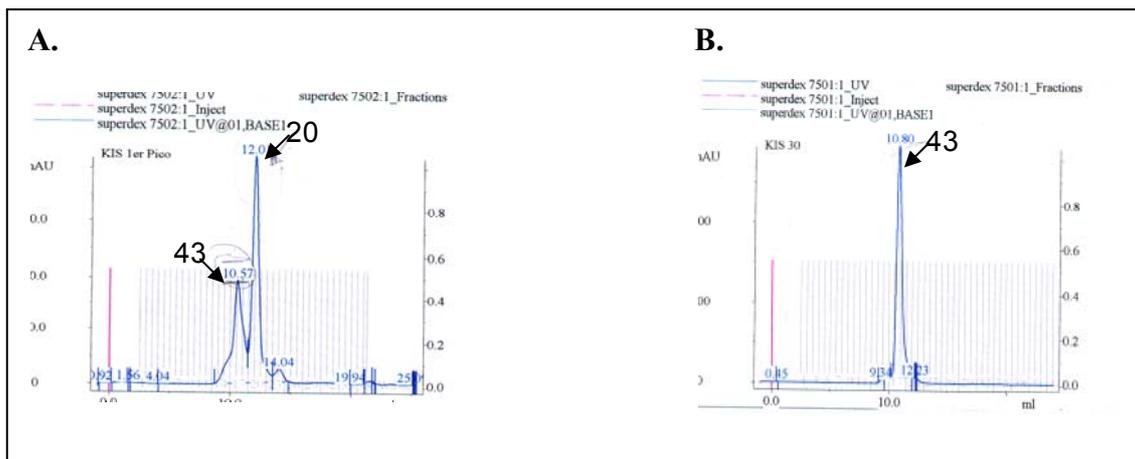


Figura 17. Purificación mediante cromatografía de exclusión molecular de las muestras procedentes del primer pico (A) y del segundo pico (B) de la cromatografía de intercambio iónico

Las fracciones correspondientes a la forma dimérica se concentraron hasta 10 mg/ml y se realizaron los primeros ensayos de cristalización mediante la técnica de gota colgante (McPherson, 1999) con las condiciones de Crystal Screen I, Crystal Screen II y McPherson screen. Se comprobó la pureza e integridad de la proteína purificada después de los diferentes pasos cromatográficos mediante SDS-PAGE y tinción de plata. Desafortunadamente, hasta el momento no se ha producido la cristalización del dominio KIS.

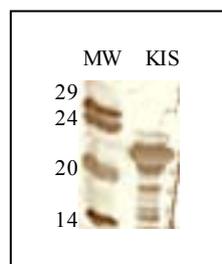


Figura 18. Análisis SDS-PAGE y posterior tinción de plata del dominio KIS después de purificar y concentrar.

1.1.2 Interacción del dominio KIS con otras proteínas con el mismo dominio

La formación *in vitro* de dímeros KIS: KIS llevó a plantear si formas diméricas podían ocurrir también con la proteína entera ZmAKIN $\beta\gamma$, a través del dominio KIS. Además, se quiso comprobar si esta interacción era específica para el dominio KIS de ZmAKIN $\beta\gamma$, o podía tener lugar con dominios KIS de otras proteínas. Para ello se realizaron experimentos de *pull down* con la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$, marcada con Met ^{35}S , y los dominios KIS de una fosfatasa de *A.thaliana* (PTP-KIS) y de ZmAKIN $\beta\gamma$.

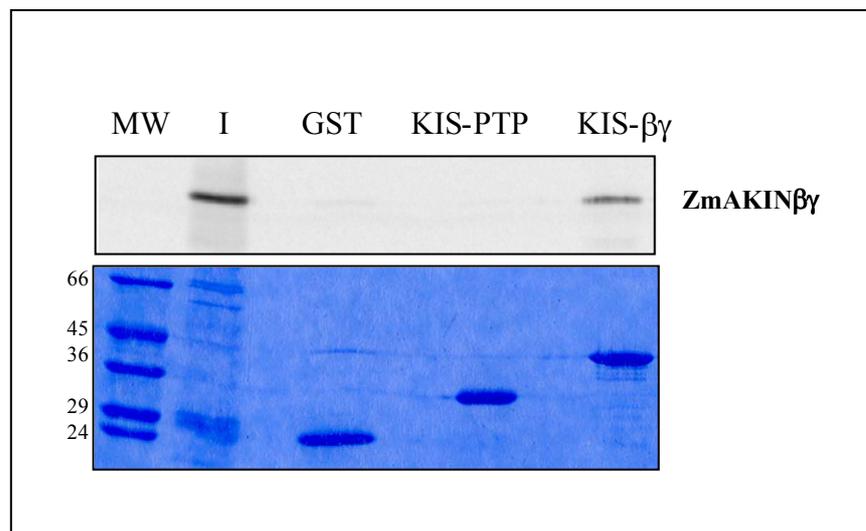


Figura 19. Ensayo pull down con la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ marcada radioactivamente y dominios KIS fusionados a GST de una proteína fosfatasa de *A.thaliana* (PTP-KIS) y de ZmAKIN $\beta\gamma$ (KIS- $\beta\gamma$). MW: marcador de peso molecular; I: input de la Tnt;

Como se observa en la figura 19 la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ marcada radioactivamente es capaz de unirse a su propio dominio KIS, pero no al dominio KIS de la proteína PTP KIS de *A.thaliana*, indicando así la especificidad de la interacción del dominio KIS, en su unión a otras proteínas que contienen dominios similares.

1.1.3 Obtención de anticuerpos policlonales contra el dominio KIS y la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$

La proteína KIS purificada se utilizó, en paralelo a los estudios de estructura, para la obtención de anticuerpos policlonales en conejo. También se sobreexpresó la proteína total ZmAKIN $\beta\gamma$ pero el rendimiento obtenido con la proteína entera fue mucho menor, debido principalmente a su acumulación en cuerpos de inclusión. Para la solubilización de esta última se utilizó el detergente sarcosil al 2%, sin embargo, cuando la proteína se intentaba eluir (después de la digestión con trombina) la mayor parte permanecía en la Sepharosa, probablemente por la precipitación al eliminar el detergente. Debido a la dificultad de elución, se decidió cargar la resina en gel SDS-PAGE y purificarla de la acrilamida, pinchando ésta al conejo y mezclando con la fracción soluble obtenida. Para ambos casos se realizaron tres pinchazos al conejo utilizando 200 μg de proteína cada vez.

Una vez obtenido el suero inmune del conejo, se realizaron los ensayos de Inmunoblot para cada uno, así como el control con el suero preinmune. Se realizó una serie de diluciones del dominio KIS purificado y se incubó con los dos anticuerpos. A una dilución 1/200 el Ab KIS es capaz de reconocer hasta 3 ng de la proteína mientras que el anticuerpo contra la proteína total presenta un título inferior (30ng), respecto al dominio KIS (figura 20).

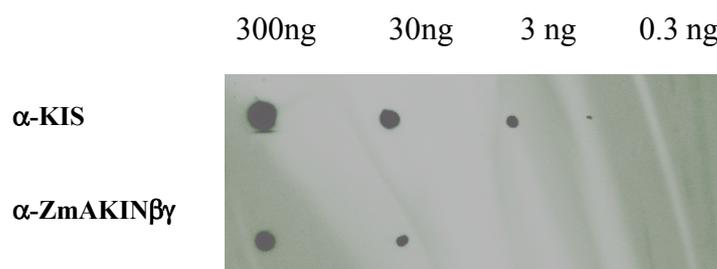


Figura 20. Titulación de los anticuerpos α -KIS y α -ZmAKIN $\beta\gamma$ por dot blot con *spots* que contienen diluciones 1/10 a partir de 0.3 μg de proteína KIS recombinante.

1.2 Estudio del patrón de expresión de ZmAKIN $\beta\gamma$

1.2.1 Estudio de la expresión del mRNA de ZmAKIN $\beta\gamma$ ante estrés osmótico

La expresión de subunidades SnRK1 está regulada transcripcionalmente por diferentes tipos de estrés ambiental, condiciones de luz o nutrientes (Bouly et al., 1999; Bradford et al., 2003; Buintik et al., 2003). La subunidad AKIN $\beta\gamma$ está involucrada en la adquisición de la tolerancia a la desecación en semillas de *M.truncatula*. Estudios previos, determinaron que ZmAKIN $\beta\gamma$ no presentaba cambios transcripcionales en diferentes tipos de estrés realizados en plántulas (Lumbreras et al. 2001). Sin embargo, un estudio más exhaustivo ha permitido determinar que ZmAKIN $\beta\gamma$ está regulada por estrés osmótico. Para caracterizar en detalle la expresión del gen, plántulas de 5 días se sometieron a un estrés osmótico provocado por 400mM manitol y se recogieron muestras a diferentes tiempos, de las cuales se extrajo RNA o proteína para su posterior análisis northern o western. La expresión del mRNA de ZmAKIN $\beta\gamma$ aumenta de manera rápida, con un máximo de inducción después de una hora de tratamiento. Este aumento es más evidente en raíz donde hay mayor expresión tanto de mRNA como de proteína.

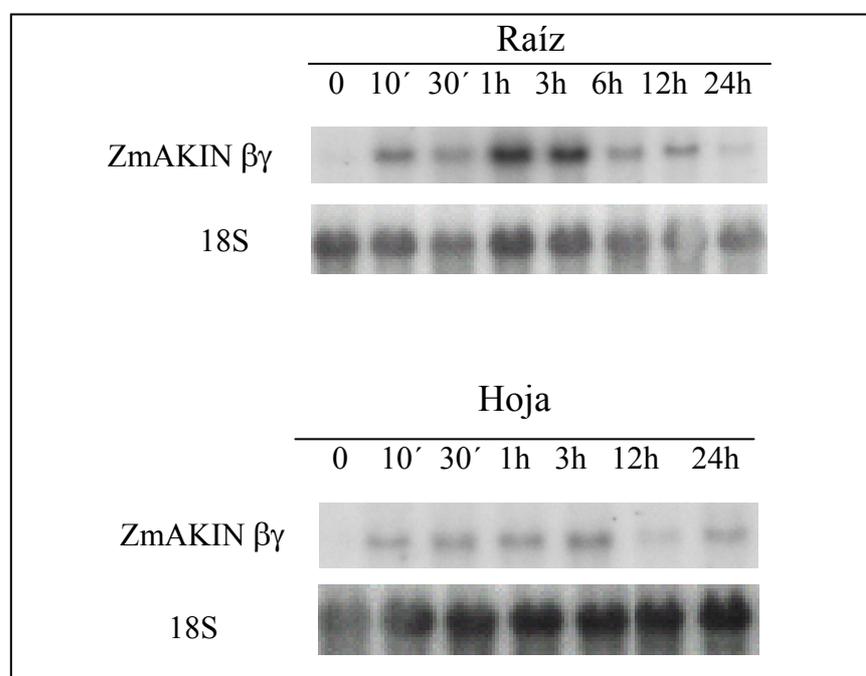


Figura 21. Análisis northern de la expresión de ZmAKIN $\beta\gamma$ ante un tratamiento de estrés osmótico en raíces y hojas de plántulas de 5 días. En la figura se muestra el control con la hibridación del ribosomal 18S.

1.2.2 Estudio de la acumulación de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$

Una vez determinada la inducción de la expresión del gen ZmAKIN $\beta\gamma$ por estrés osmótico, se estudió si se correlacionaba con el patrón de expresión de la proteína, en los mismos tratamientos. Para el estudio de la expresión de proteína, se utilizó el anticuerpo contra el dominio KIS, que presenta un título más alto (1:1000), y a nivel de western resulta más específico. Así, se determinó que los niveles de proteína también aumentan ante el estrés osmótico provocado por manitol, como se observa en la figura 22. Este aumento, sin embargo, es más tardío que en el caso del mRNA (el nivel máximo de inducción está entre 12-24h de tratamiento) y no se detecta a nivel de hoja. El anticuerpo reconoce dos bandas, que podrían corresponder a las dos isoformas existentes de ZmAKIN $\beta\gamma$, siendo la de menor tamaño, la que incrementa de manera más significativa, ante el tratamiento.

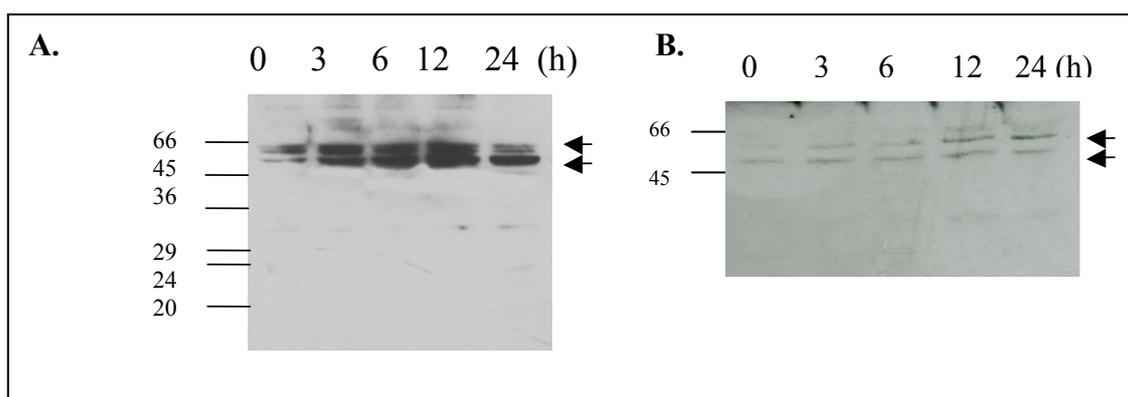


Figura 22. Análisis Western con el anticuerpo KIS de muestras de raíz (a) y hoja (b) sometidas al mismo tratamiento osmótico durante diferentes tiempos. Los números indican tiempo de tratamiento en horas.

Resultados previos a este trabajo indicaban que el transcrito ZmAKIN $\beta\gamma$ no variaba ante un tratamiento con la hormona ácido abscísico (*Lumbreras et al., 2001*). Para determinar si ocurría lo mismo con la proteína, plántulas de 5 días se sometieron a un tratamiento con ABA 100 μ M durante diferentes tiempos. Se realizó western blot a partir de extractos de las raíces de estas plantas, hibridando de nuevo con el anticuerpo parcial. Como se observa en la figura 23, la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ aumenta en presencia de ABA. Estos resultados sugieren que ZmAKIN $\beta\gamma$ tiene una función en situaciones de estrés osmótico.

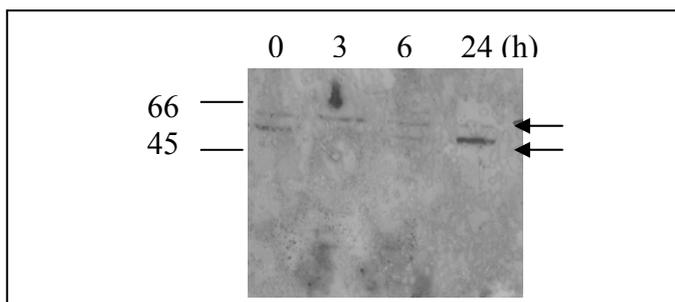


Figura 23. Análisis western con el anticuerpo contra el dominio KIS de muestras de raíz incubadas diferentes tiempos con una solución de ABA 100 μ M.

1.3 Interacción de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ con subunidades catalíticas SnRK

Diferentes estudios apoyan la interacción de subunidades del tipo AKIN $\beta\gamma$ con las subunidades catalíticas SnRK1 (Lumbreras et al., 2001), sin embargo, estos resultados proceden de estudios de doble híbrido. Como aproximación al estudio *in vivo* de la interacción de ZmAKIN $\beta\gamma$ con subunidades catalíticas SNRK1 se utilizaron los anticuerpos generados en este trabajo para realizar inmunoprecipitaciones de extractos totales de raíz de plántulas de maíz de 5 días tratadas o no tratadas con manitol (10 h), condición en que se produce un incremento en la expresión de ZmAKIN $\beta\gamma$. A partir de un extracto total de 200 μ g de proteína se realizó la inmunoprecipitación añadiendo en cada caso 1 μ l de suero Inmune o suero Preinmune). Se utilizó el suero contra la proteína total por ser el único de los dos obtenidos, capaz de inmunoprecipitar *in vitro* la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$. Después de 4h de incubación con el anticuerpo se añadió proteína Sepharosa A, con el objetivo de purificar los complejos. Tras realizar los sucesivos lavados se realizó el ensayo quinasa tal y como se describe en Material y Métodos (apartado 2.14) y se procedió al contaje del sobrenadante, que contiene el sustrato SAMS (específico para quinasas SnRK1), mediante centelleo líquido. Como se observa en la figura 24, la inmunoprecipitación con el anticuerpo contra la proteína total resulta en un incremento 10X de la incorporación de fosfato al péptido SAMS, lo cual indica una asociación *in vivo* de ZmAKIN $\beta\gamma$ con subunidades SnRK1. La actividad del inmunoprecipitado no aumenta en las muestras sometidas a estrés osmótico, que presentan contrariamente, mayor expresión de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$.

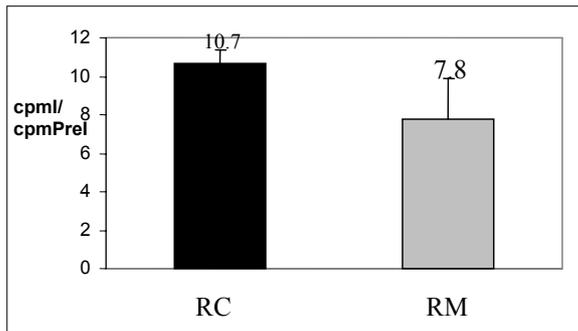


Figura 24. Actividad SAMS de los inmunoprecipitados de extractos de raíz control (C) o raíz sometida a estrés osmótico provocado por tratamiento con manitol (M). El resultado se expresa como cpm obtenidas utilizando suero Inmune , respecto a cpm obtenidas con suero preInmune.

El hecho de que la inducción de la expresión de ZmAKINβγ no estuviera correlacionada con una aumento en la actividad SnRK1 llevó a cuestionarse si ZmAKINβγ estaba asociada con otro tipo de subunidades catalíticas. Como se ha comentado en la introducción, en plantas, la familia SnRK está formada por tres subfamilias, de las cuales SnRK2 y SnRK3 son más divergentes respecto a SNF1. Proteínas pertenecientes al grupo SnRK2 se ha descrito que actúan en la vía de transducción de estrés osmótico, tanto dependiente como independiente de ABA (Halford et al., 2003). A pesar de que estas quinastas se han descrito como monoméricas, se decidió probar si ZmAKINβγ era capaz d modular la actividad SnRK2. Se realizaron ensayos de actividad con una proteína de maíz, perteneciente al grupo SnRK2, e implicada en la vía de transducción de ácido abscísico (Tesis doctoral, A.Moreno). La proteína recombinante SnRK2 utilizada, presenta actividad quinasa *in vitro*. Al incubar esta quinasa con concentraciones crecientes de la proteína ZmAKINβγ, la actividad de SnRK2 aumenta, tanto a nivel de autofosforilación como de transfosforilación (figura 25) por lo que se concluye que, al menos *in vitro*, ZmAKINβγ es capaz de modular positivamente la actividad de un miembro de la familia SnRK2.

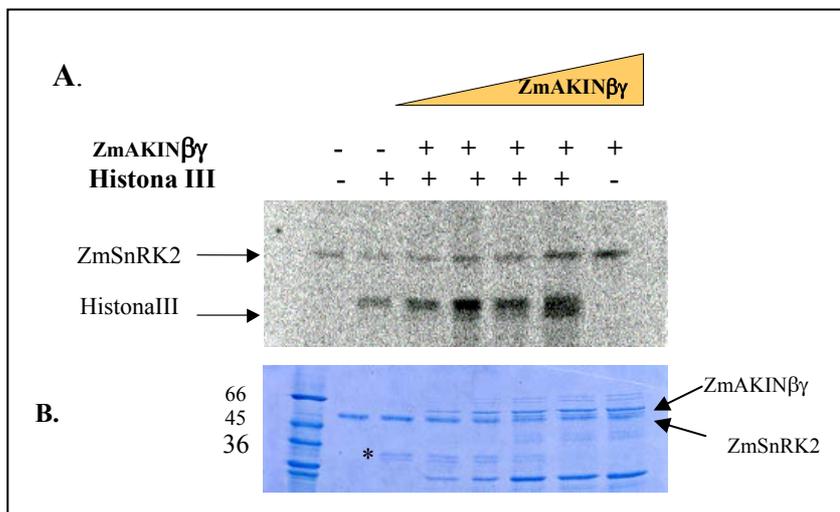


Figura 25. Ensayo de actividad SnRK2 en presencia de cantidades crecientes de la proteína ZmAKINβγ y utilizando como sustrato histona III. (A) Autoradiografía (B) Coomassie. El asterisco señala las dos bandas correspondientes a la histona III

1. 4 Estudio de la localización subcelular de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$

La localización subcelular de una proteína puede proporcionar pistas importantes sobre su función celular. En levadura se ha descrito que la localización subcelular de la quinasa SNF1 está regulada por las subunidades β y además estos componentes son los responsables de la interacción de SNF1 con sustratos específicos (Schmidt and McCartney, 2000). Con el objetivo de determinar si ZmAKIN $\beta\gamma$ juega un papel similar al de estas subunidades, y su localización varía dependiendo de la situación fisiológica de la célula, se fusionó la proteína a GFP y se transformó de manera transitoria, y mediante biolística, en células epidérmicas de cebolla. Como se observa en la figura 26, la proteína de fusión se localiza tanto en núcleo como en citoplasma a pesar de no encontrarse ninguna señal de localización nuclear conocida. La improbabilidad de transporte pasivo a través de la envoltura nuclear debido al tamaño de la proteína quimérica podría indicar que ZmAKIN $\beta\gamma$ estaría asociada a otras proteínas que la dirigirían a núcleo.

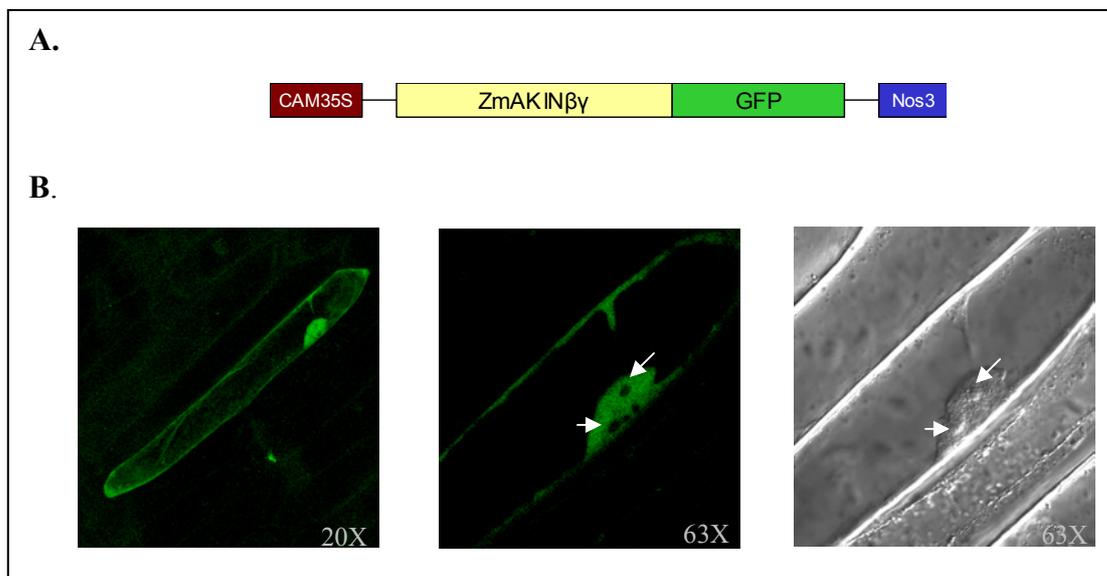


Figura 26. Localización subcelular de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ en células de cebolla. (A) Detalle de la construcción utilizada. (B) Imágenes obtenidas con el microscopio confocal de células de cebolla transformadas con la construcción ZmAKIN $\beta\gamma$ -GFP. Izquierda: Vista general (amplificación 20X), centro: detalle núcleo (63X), derecha: imagen de transmisión (Nomarsky). Las flechas indican los nucleolos.

Células transformadas se incubaron en medio con manitol, o sin sacarosa, para ver si estas condiciones provocaban cambios en la localización subcelular pero no se observaron diferencias en su distribución.

**Capítulo II: Identificación de nuevos componentes del complejo
SnRK1 de maíz**

2.1 Identificación de nuevas subunidades del complejo SnRK1

2.1.1 Identificación y aislamiento de clones codificantes para subunidades catalíticas SnRK1

Una vez caracterizada la subunidad ZmAKIN $\beta\gamma$ el siguiente objetivo fue determinar con qué subunidad podía formar complejos esta proteína. Para ello, como primera aproximación se realizó una búsqueda de ESTs de maíz, en las bases de datos NCBI y Maize Genomic database, que presentaran homología con diferentes subunidades catalíticas del complejo SnRK1 ya descritas en otras especies. Mediante el programa BLASTn, utilizando las secuencias de *A.thaliana* (AY149927) y *O.sativa* (D82039, D82038) se encontraron tres ESTs: AY112453, AY107942 y AY112953. La primera de ellas representaba el cDNA completo codificante para una proteína con homología a las subunidades catalíticas pertenecientes al subgrupo SnRK1b. Las otras dos ESTs representaban cDNAs parciales del extremo N-terminal y C-terminal codificantes para una subunidad del subgrupo SnRK1a. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada una de las subunidades catalíticas y se aislaron, mediante RT-PCR a partir de RNA de plántulas de 5 días, 2 cDNAs codificantes para dos proteínas con homología a las subunidades catalíticas SnRK1 que denominamos *ZmSnRK1a* y *ZmSnRK1b*, de 503 y 509 aminoácidos y con un PM teórico de 57.4 y 58.2, respectivamente.

En la figura 27 se muestra la secuencia aminoacídica deducida para cada uno de estos cDNAs, así como los dominios conservados en miembros de la misma familia. Ambas proteínas presentan un dominio quinasa muy conservado en su extremo N-terminal que se enmarca en negro. Dentro de éste se encuentra el dominio de unión a ATP, subrayado en rojo, y una treonina conservada, marcada en naranja, y que se encuentra en el denominado T-loop o segmento de activación, común a muchas quinasas y cuya fosforilación es necesaria para la activación de estas proteínas (Johnson et al., 1996). Esta treonina está fosforilada cuando la quinasa está activa, tanto en plantas, como en mamíferos y levaduras (Sudgen et al. 1999; Hardie et al. 1998; Estruch et al., 1992). Como ya se ha descrito en otras subunidades SnRK1 (pero no en las subunidades AMPK), *ZmSnRK1a* y *ZmSnRK1b* presentan un dominio UBA (Ubiquitine-Associated domain) de 45 aminoácidos que se marca en verde en la figura. Este dominio se ha descrito en proteínas asociadas a ubiquitina o vías de ubiquitinación

así como enzimas de reparación del ADN o implicadas en ciclo celular (Hofmann and Bucher, 1996). La estructura de estos dominios está muy conservada y forma una estructura compacta de tres hélices con una zona hidrofóbica común en la superficie que se ha postulado ser responsable de la interacción con proteínas (Mueller and Feigon, 2002).

A.



```

MDGSSKSGSH SEALRNYNLG RTLGIGTFGK VKIAEHKLTG HRVAIKIINC RQMRNMEMEE 60
KAKREFKILK LVIHPHIIRL YEVIYTSTDI YVMEYCKYG ELFDYIVEKG RLQEDEARRI 120
FQQIISGVEY CHRMVVHRD LKPENLLDLS KYNVKLADFG LSNVMHDGHF LKTSCGSPNY 180
AAPEVISGKL YAGPEVDVWS CGVILYALLC GTLPFDDENI PNLFKKIKGG IYTLPSHLSA 240
LARDLIPRML VVEPMKRITI REIREHQWFQ IRLPRYLAVP PPDTTQQAKM IDEDTLRDVV 300
NMGFNKNHVC ESLCSRLQNE ATVAYLLLD NRFRATSGYL GADYQESMDR NLNQLASSES 360
SSSGTRSYVP GSSDPHSSGL RPYYPVERKW ALGLQSRHP REIMVEVLKA LQELNVRWKK 420
NGHYNVKCRW CPGFPEVNDT LDASNSFLGD STIMDNDDAN GRLPTVIKFE FQLYTKDDK 480
YLLDMQRVTG PQLLFLDFCA AFLTKLRVL 509
    
```

B.

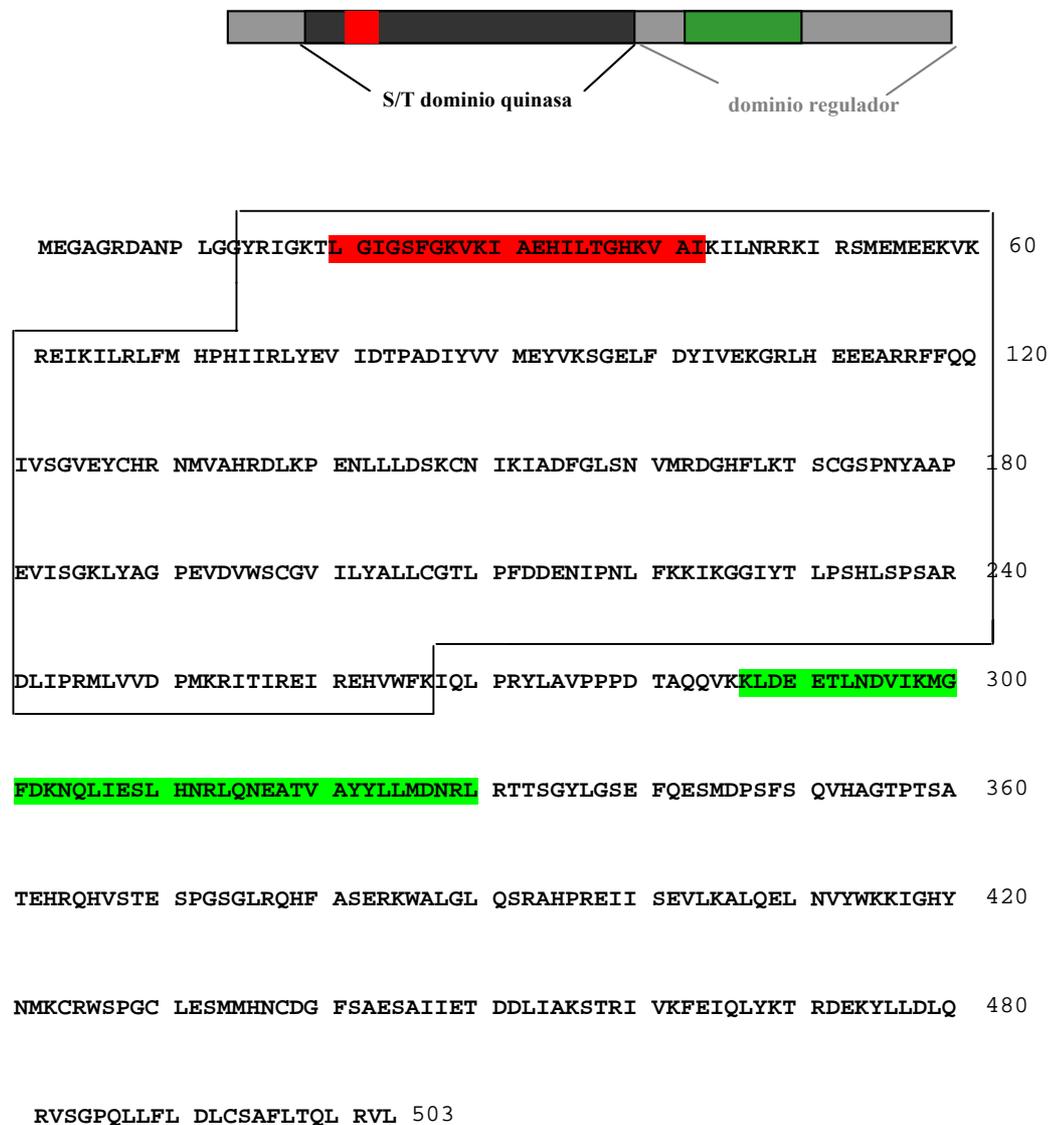


Figura 27. Secuencia aminoacídica deducida de ZmSnRK1b (A) y ZmSnRK1a (B). El código de colores se detalla en el texto.

Se ha realizado un análisis CLUSTALW (Thompson et al., 1997) de las secuencias aminoacídicas de ZmSnRK1b y ZmSnRK1a con otros miembros de la familia SNF1: AKIN11 de *A. thaliana*, OSK1(subgrupo a), OSK4 y OSK5 (subgrupo b) de *O. sativa*, AMPK de *H. sapiens* y SNF1 de *S. cerevisiae* (figura 28).

ZmSnRK1b	MDGS-----	-----	-----	SKGS	GHS-----	-----	E	ALRNYNLGRT	22
OSK4	MEGN-----	-----	-----	ARGG	GHS-----	-----	E	ALKNYNLGRT	22
OSK5	MDGN-----	-----	-----	AKGG	GHS-----	-----	E	ALKNYNLGRT	22
ZmSnRK1a	MEC-----	-----	-----	AGRD	ANP-----	-----	-	LGGRIRGKT	19
OSK1	MEC-----	-----	-----	AGSD	GNP-----	-----	-	LGGRIRGKT	19
AKIN11	MDHS-----	-----	-----	SNRF	GNGV-----	-----	ES	ILPNYKLGKT	25
AMPK	MATA-----	-----	-----	EKQK	HDG-----	-----	RV	KIGHYILGDT	23
SNF1	MSSNNNTNTA	PANANSSHHH	HHHHHHHHHH	CHGGSNSTLN	NPKSSSLADGA	HIGNYQIVKT			60
ZmSnRK1b	LGIGTFGKVK	IAEHKLTGHR	VAIKILNCRQ	MRNMEMEKA	KREIKILKLV	IHPHIIRLYE			82
OSK4	LGIGSFGKVK	IAEHKLTGHR	VAIKILNRRQ	MRNMEMEKA	KREIKILRLF	IHPHIIRLYE			82
OSK5	LGIGSFGKVK	IAEHKLTGHR	VAIKILNRRQ	MRNMEMEKA	KREIKILRLF	IHPHIIRLYE			82
ZmSnRK1a	LGIGSFGKVK	IAEHILTGHK	VAIKILNRRK	IRSMEMEKV	KREIKILRLF	MHPHIIRLYE			79
OSK1	LGIGSFGKVK	IAEHILTGHK	VAIKILNRR-	KSMEMEKV	KREIKILRLF	MHPHIIRLYE			77
AKIN11	LGIGSFGKVK	IAEHVVTGHK	VAIKILNRRK	IKNMEMEKV	RREIKILRLF	MHPHIIRQYE			85
AMPK	LGIGTFGKVK	VGRHELTGHK	VAIKILNRQK	IRSLDVVGI	RREIQNLKLF	RHPHIIRLYD			83
SNF1	LGIGSFGKVK	LAVHTTTGQK	VAIKILNKKV	LAKSDMQGRI	BREISYLRLL	RHPHIIRLYD			120
ZmSnRK1b	VLYTSTDIYV	VMEYCKVGEI	FDYIVEKGR	QEDARRIFQ	QIISGVEYCH	RNMVVHRDLK			142
OSK4	VLYTPTDIYV	VMEYCKVGEI	FDYIVEKGR	QEDARRIFQ	QIISGVEYCH	RNMVVHRDLK			142
OSK5	VLYTPTDIYV	VMEYCKVGEI	FDYIVEKGR	QEDARRIFQ	QIISGVEYCH	RNMVVHRDLK			142
ZmSnRK1a	VLDTPADIYV	VMEYVKSSEL	FDYIVEKGR	HEBEARRFFQ	QIVSGVEYCH	RNMVAVHRDLK			139
OSK1	VLDTPADIYV	VMEYVKSSEL	FDYIVEKGR	QEBEARRFFQ	QIISGVEYCH	RNMVVRRDLK			137
AKIN11	VLETTSDIYV	VMEYVKSSEL	FDYIVEKGR	QEDARRFFQ	QIISGVEYCH	RNMVVHRDLK			145
AMPK	VISTPDIYV	VMEYVSGSEL	FDYICVNGR	DEKESRRRFQ	QILSGVDYCH	RHMVVHRDLK			143
SNF1	VIKSKDETIM	VLEYAG-NEL	FDYIVQRDKM	SEQEARRFFQ	QIISGVEYCH	RHKIVHRDLK			179
ZmSnRK1b	PENLLLDISKY	NVKLADFGLS	NVMHDGHFLK	TSCGSPNYAA	PEVISGKLYA	GPEVDVWSCG			202
OSK4	PENLLLDISKY	NVKLADFGLS	NVMHDGHFLK	TSCGSPNYAA	PEVISGKLYA	GPEVDVWSCG			202
OSK5	PENLLLDISKY	NVKLADFGLS	NVMHDGHFLK	TSCGSPNYAA	PEVISGKLYA	GPEVDVWSCG			202
ZmSnRK1a	PENLLLDISKY	NVKIADFGLS	NVMRDGHFLK	TSCGSPNYAA	PEVISGKLYA	GPEVDVWSCG			199
OSK1	PENLLLDISKY	NVKIADFGLS	NVMRDGHFLK	TSCGSPNYAA	PEVISGKLYA	GPEVDVWSCG			197
AKIN11	PENLLLDISKY	NVKIADFGLS	NVMRDGHFLK	TSCGSPNYAA	PEVISGKLYA	GPEVDVWSCG			205
AMPK	PENVLLDAHM	NAKIADFGLS	NMMSDGEFLR	TSCGSPNYAA	PEVISGRLYA	GPEVDLWSCG			203
SNF1	PENLLLDISKY	NVKIADFGLS	NVMRDGHFLK	TSCGSPNYAA	PEVISGKLYA	GPEVDVWSCG			239
ZmSnRK1b	VILYALLCGT	LFPDDENIPN	LFKKIKGGIY	TLPSHLSALA	RDLIIPRMLV	DPMKRITIRE			262
OSK4	VILYALLCGT	LFPDDENIPN	LFKKIKGGIY	TLPSHLSALA	RDLIIPRMLV	DPMKRITIRE			262
OSK5	VILYALLCGT	LFPDDENIPN	LFKKIKGGIY	TLPSHLSALA	RDLIIPRMLV	DPMKRITIRE			262
ZmSnRK1a	VILYALLCGT	LFPDDENIPN	LFKKIKGGIY	TLPSHLSPSA	RDLIIPRMLV	DPMKRITIRE			259
OSK1	VILYALLCGT	LFPDDENIPN	LFKNIKGGIY	TLPSHLSPLG	RDLIIPRMLV	DPMKRITIRE			257
AKIN11	VILYALLCGT	LFPDDENIPN	LFKKIKGGIY	TLPSHLSSEA	RDLIIPRMLV	DPMKRITIRE			265
AMPK	VILYALLCGT	LFPDDDHVPT	LFKKICDGI	YTPQVLPNSV	ISLTKHMLQV	DPMKRITIRE			263
SNF1	VILYVMLCRR	LFPDDSTIPV	LFKNISNGVY	TLPKFLSPGA	AGLTKRMLIV	NPLNRTSIRE			299
ZmSnRK1b	IREHQWFQIR	LPRYLAVPPP	-----	-----	DTIQ	QAKMIDEDTL	RDVVN-MGFN		305
OSK4	IREHQWFQIR	LPRYLAVPPP	-----	-----	DTAQ	QAKMIDEDTL	QDVVN-LGYE		305
OSK5	IREHQWFQIR	LPRYLAVPPP	-----	-----	DTAQ	QAKMIDEDTL	QDVVN-LGYE		305
ZmSnRK1a	IREHVWFQIR	LPRYLAVPPP	-----	-----	DTAQ	QVKKLDEBTL	NDVVK-MGFD		302
OSK1	IREHQWFQIR	LPRYLAVPPP	-----	-----	DTAQ	QVKKLDEBTL	NDVVK-MGFD		300
AKIN11	IRQHRWFQTH	LPRYLAVSPP	-----	-----	DTVE	QAKKINEEIV	QEVVN-MGFD		308
AMPK	IREHEWFQOD	LPKYLFPE--	-----	-----	DPSY	SSTMIDDEAL	KEVCEKFCS		305
SNF1	IMQDDWFQVD	LPEYLLPFDL	KPHPEENEN	NDSKKDGSSP	DNDEIDNLY	NILSSTMGYE			359
ZmSnRK1b	KNHVCESLCS	R---LQNEA	TVAYYLLLDN	R-----	F	RATSGYLGAD	YQESMDRNLN		353
OSK4	KDHVCESLRN	R---LQNEA	TVAYYLLLDN	R-----	F	RATSGYLGAD	YQESLERNLN		353
OSK5	KDHVCESLRN	R---LQNEA	TVAYYLLLDN	R-----	F	RATSGYLGAD	YQESLERNLN		353
ZmSnRK1a	KNQLIESLHN	R---LQNEA	TVAYYLLMDN	R-----	L	RTTSGYLGSE	FQESMDPSFS		350
OSK1	KNQLIESLHK	R---LQNEA	TVAYYLLLDN	R-----	L	RTTSGYLGAE	FHESMVSSLA		348
AKIN11	RNQVLESILRN	R---LQNEA	TVAYYLLLDN	R-----	F	RVPSGYLESE	FQETDSSGN		356
AMPK	EEVLSCLYN	RN---HODPL	AVAYELIIDN	RRIM-----	N	EAKDFYIATS	PPDSFLDDHH		357
SNF1	KDEIYESLES	SEDTPAFNEI	RDAYMLIKEN	KSLIKDMKAN	KSVSDELDTF	LSQSPPTFQQ			419

ZmSnRK1b	QLASSESSS	---SGTRSYV	PGSSDPHSSG	LRPYYP	----	-----	-----	385
OSK4	RFASSEAS	---SNTRHYL	PGSSDPHAG	LRPHY	----	-----	-----	385
OSK5	RFASSEAS	---SNTRHYL	PGSSDPHAG	LRPHY	----	-----	-----	385
ZmSnRK1a	QVH-AGTPT	---SATEHRQ	HVSTESPGSG	LRQHFA	----	-----	-----	381
OSK1	QVTPAETPN	---SADHRQ	HGHMESPFGF	LRHHFA	----	-----	-----	380
AKIN11	PMRTPAAGA	---SPVGHWI	PAHVDHYGLG	ARSQVE	----	-----	-----	388
AMPK	LTRPHPERVP	FLVAEIPRAR	HTLDELNPQK	SKHGV	----	-----	-----	393
SNF1	QSKSHQKSQV	DHETAKQAR	RMASAITQQR	TYHQSIFMDQ	YKEEDSTVSI	LPTSLPQIHR		479
ZmSnRK1b	-----	-----	-VERKWALGL	QSRAHPREIM	VEVLKALQEL	NVRWKKNGH-		423
OSK4	-----	-----	-VERKWALGL	QSRAQPREIM	IEVLKALQEL	NVCWKKNGQ-		423
OSK5	-----	-----	-VERKWALGL	QSRAQPREIM	IEVLKALQEL	NVSWKKNGQ-		423
ZmSnRK1a	-----	-----	-SERKWALGL	QSRAHPREIT	SEVLKALQEL	NVYWKKIGH-		419
OSK1	-----	-----	-ADRWALGL	QSRAHPREIT	TEVLKALQEL	NVCWKKIGH-		418
AKIN11	-----	-----	-VDRKWALGL	QSHAPREIM	NEVLKALQEL	NVCWKKIGH-		426
AMPK	-----	-----	-RKAKWHLGI	RSQSRNDIM	AEVCRAIKQL	DYEWKVVNP-		431
SNF1	ANMLAQGSPA	ASKISPLVTK	KSKTRWHFGI	RSRSYELDVM	GETYTALKNL	GAEWAKPSEE		539
ZmSnRK1b	--YNVKCRWC	PGFP-EVNDT	LDASNSFLGD	STIMD	----	---NDDANGR	LPTVIKFFEQ	472
OSK4	--YNMKCRWS	VGYP-QATDM	LDVNHSEVDD	SIIIMD	----	---NGDVNGR	LPAVIKFFEQ	472
OSK5	--YNMKCRWS	VG-T-QATDM	LDVNNSEVDD	SIIIMD	----	---NGDVNGR	LPAVIKFFEQ	471
ZmSnRK1a	--YNMKCRWS	P--G-CLESM	MHNCDFSAE	SATIE	----	---TDDLIAK	STRIVKFFEQ	466
OSK1	--HNMKCRWS	PSFP-SHESM	MHNNHGFCAA	SAMIE	----	---TDD-SEK	STHTVKFFEQ	466
AKIN11	--YNMKCRWV	PGLADGQNTM	VNNQLHERDE	SSIE	----	---DDC-AMT	SPTVIKFFEQ	475
AMPK	--YYLRVRRK	NPVTSTYSKM	SLQLYQVDSR	TYLLDFRSID	DEITEAKSGT	ATPQRSQSVS		489
SNF1	DLWTIKDRWK	YDIGNKTNTN	EKIPDLMKMV	IQLFQ	----	---IET	NNYLVDKFD	587
ZmSnRK1b	LYKTKD	----	-----	DKYLLDMQRV	TGPO	---LLF	LDFCAAFLTK	505
OSK4	LYKSRD	----	-----	EKYLLDMQRV	TGPO	---LLF	LDFCAAFLTK	505
OSK5	LYKTRD	----	-----	EKYLLDMQRV	TGPO	---LLF	LDFCADFLTK	504
ZmSnRK1a	LYKTRD	----	-----	EKYLLDLQRV	SGPO	---LLF	LDLCSAFLTQ	499
OSK1	LYKTRD	----	-----	EKYFLDLQRL	SGPO	---LLF	LDLCSAFLTQ	499
AKIN11	LYKARE	----	-----	EKYLLDLQRV	NGPO	---FLF	LDLCAAFLTE	508
AMPK	NYRSCQRSDS	DAEAQGSSE	VSLTSSVTSL	DSSPVDLTPR	PGSHT	---IEF	FEMCANLTKI	547
SNF1	GWESSYG	----	-----D	DTTVSNISED	EMSTFSAYPF		LHLTKLIME	625
ZmSnRK1b	LRVL	----	509					
OSK4	LRVL	----	509					
OSK5	LRVL	----	508					
ZmSnRK1a	LRVL	----	503					
OSK1	LRVL	----	503					
AKIN11	LRVI	----	512					
AMPK	LAQ	----	550					
SNF1	LAVNSQSN		633					

Figura 28. Alineamiento CLUSTALW de las secuencias aminoacídicas de ZmSnRK1b y ZmSnRK1a con otros miembros de la familia SNF1: OSK4 (D82035.1), OSK5 (D82036.1) y OSK1 (D82039.1) de *O. sativa*; AKIN11 (AY149927) de *A. thaliana*; AMPK α 1 (NP00642) de *H. sapiens* y SNF1 (NP010765) de *S. cerevisiae*.

El putativo dominio quinasa se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína y contiene los 11 subdominios común a proteínas quinasas (Hanks et al., 1988). Este dominio es el que presenta mayor homología de secuencia entre los diferentes miembros de la familia, mientras que el dominio C-terminal, o dominio regulador y responsable de las interacciones con los demás miembros del complejo, es mucho más divergente. Las proteínas ZmSnRK1a y ZmSnRK1b presentan entre ellas un 89% de similitud, siendo ésta mayor en el dominio quinasa (93%) que en el regulador (84%). Respecto a otros miembros de la familia más lejanos como SNF1 de *S. cerevisiae*, la

similitud es para ambas secuencias de un 71% en el dominio catalítico mientras que en el regulador es, de un 42% con ZmSnRK1a, y de un 34% con ZmSnRK1b. La comparación con las secuencias existentes de plantas indican que ZmSnRK1b es más próxima a las subunidades clasificadas dentro del subgrupo b (OSK4 o OSK5), exclusivo de cereales, mientras que ZmSnRK1a presenta mayor similitud con las proteínas quinasas clasificadas dentro del subgrupo a. Dentro de la misma subfamilia, la mayor divergencia se da también en el extremo C-terminal. Para el caso de ZmSnRK1b, ésta mantiene un 92 y 99% de similitud en su dominio quinasa y un 83 y 94% en el dominio regulador con OSK1 y OSK2, respectivamente. ZmSnRK1a presenta un 96 y 93% en el dominio quinasa, y un 89 y 83% en el dominio regulador de OSK1 y OSK4. El análisis filogenético confirma la clasificación de ZmSnRK1a y ZmSnRK1b en grupos diferentes (figura 29)

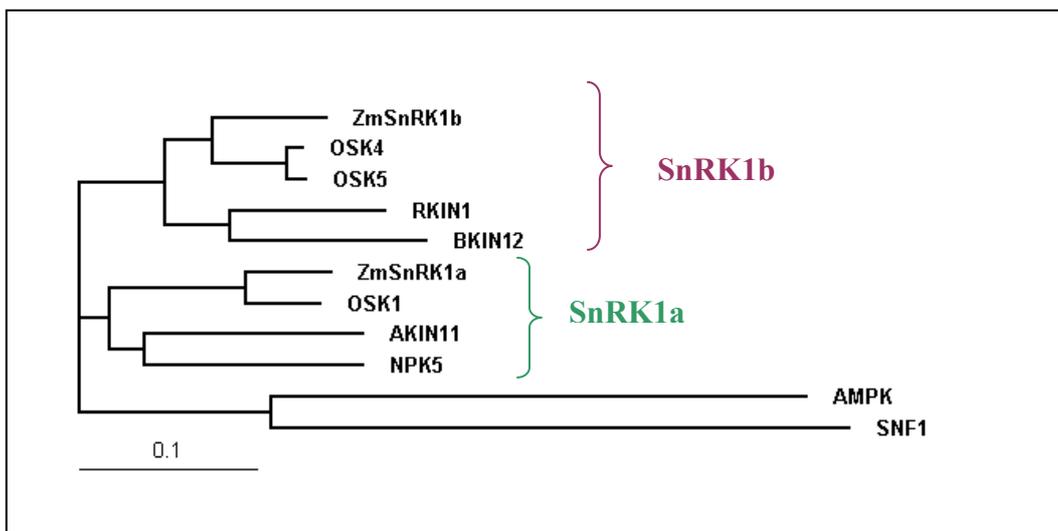


Figura 29. Análisis filogenético de diferentes quinasas SnRK1 y las subunidades catalíticas de *H. Sapiens* (AMPK) y *S.cerevisiae* (SNF1), a partir de análisis CLUSTALW y utilizando el programa Treeview (Page, 1996). Además de las subunidades alineadas en la figura anterior se incluye una subunidad de centeno (RKIN1), una subunidad de cebada (BKIN12) y la subunidad de tabaco, NPK5. Los dos grupos que forman las subunidades vegetales se marcan en diferente color.

2.1.2 Identificación y aislamiento de clones codificantes para subunidades β del complejo SnRK1

La estrategia llevada a cabo para identificar subunidades β de maíz fue utilizar las secuencias de *A.thaliana* AKIN β 1 (AY088139) y AKIN β 2 (AJ132316) para realizar el BLASTn contra las ESTs de maíz existentes en el momento. Sólo se identificaron dos

ESTs parciales que presentaban homología con AtAKIN β 1: AY109218 y BM381600. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la zona codificante y se aisló un cDNA con homología a las subunidades β 1, que se ha denominado Zm β 1. Su secuencia aminoacídica deducida es de 301 aminoácidos con un PM teórico de 32 kDa y P.I 4.9. Se ha realizado un alineamiento con otras subunidades β de plantas (figura 30) donde se ha marcado, según Jiang and Carlson (1997), los dominios característicos KIS y ASC.

Zmbeta1	MGNASGREED	AAAVDGDGAD	VEDGGGSSV	RSSERAFPPY	GSVGANHVRR	ACSVGVVGGG	60
Osbeta1	MGNASGREED	PAAAAGEG-D	VED---SSV	RSSERGFPPY	G-GGGNHVRR	ACSVGVVGGG	54
StGAL83	MGNANAREDG	AAVDGDGDGE	VSG---RRS	NVESGIVEDH	H---ALTSRV	PSADLMVN--	51
Mtbeta1	MGNANGREED	AIPD---AGD	PSG---R--	-----EPH	A---PPPIRA	FSSDSMAN--	39
Atbeta1	MGNANGKDED	AAAG-SGGAD	VTS---SSA	RSNGG--DPS	A---RSRHR	PSSDSMSS--	48
Mtb2	MGNVNGRED	FNGT-LSSAS	STS---SEV	S--DSMSAPD	G---VVEN	PSPVELMGH-	47
Atbeta2	MGNVNAAREEA	NSNN-ASAVE	DED---AEI	CSREAMSAAS	-----DGNH	VAPPELMGQ-	48
Atbeta3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
Zmbeta1	GGAGSPPGSP	GHSLSPRMFV	POIPVPPLQR	AADVTPVFNQ	ILMNDQEEFY	DGF-PQKEIP	119
Osbeta1	GGAGSPPGSP	GRSLSPRMFV	POIPVPPLQR	AADVTPVFNR	ILMNEQEEFY	DGF-PQKEIP	113
StGAL83	---SPPQSP	HRSASPLLFQ	POVPVPLQR	G-DGNPVSNO	MWGNEDAS	DHS-LEGGIP	105
Mtbeta1	---SPPQSP	RRSRSPILFQ	POVPLAPLQR	--NGPPFLNQ	MWQNEPHGIV	NQA-PEQGIP	92
Atbeta1	---SPPGSP	ARSPSPFLFA	POVPVAPLQR	A-NAPPSPMN	IQWNQSRVF	DNF-PEQGIP	102
Mtb2	---SPPASP	RTTOSPLMFT	POAPVVPQR	P-DEMQVPS	SLMQT-NSGY	EDMFSEIGIP	101
Atbeta2	---SPPHSP	RATOSPLMFA	POVPVLPQR	P-DEIHIPNP	SWMQSPSSLY	EEASNEQGIP	103
Atbeta3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
Zmbeta1	SLIVWTLGGK	NVYVEGSDWN	WKSRRAMQKS	GKDHSLLTVL	PSCVYRYRFV	VDGERKCLPD	179
Osbeta1	VLIVWTLGGK	NVSVEGSDWN	WKSRRPMQKS	GKDHSLLTL	PSCVYRYRFV	VDGERKCLPD	173
StGAL83	TLITWSYGGN	NVAIQGSDWN	WTSRKLQRS	GKDYTVLTVL	PSCHYHYRFI	VDGEVRYLPE	165
Mtbeta1	VMITWNYGGN	SVAVEGSDWN	WASRKVLQR	GKDHSILTVL	PSCIFHYRFI	VDGEQRYTPD	152
Atbeta1	TIITWNQGGN	DVTVEGSDWN	WRSRKKQRS	GKDHSILTVL	PSCHYHYRFI	VDGESKYIPD	162
Mtb2	TMITWSYDQK	EVAVEGSDWN	WKTTRMPLQRS	GKDFTIMKVL	PSCVYQRFI	VDGQWRYPD	161
Atbeta2	TMITWCHGGK	EIAVEGSDWN	WKTTRSLQRS	GKDFTIMKVL	PSCVYBYRFI	VDGQWRHAPD	163
Atbeta3	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
Zmbeta1	LPCEIDAMGN	AVNLLDVNDF	VPESVESVVE	FEPPLSPDSS	YSFQAPEDKD	FAKEPPALPA	239
Osbeta1	LPCEIDIMGN	AVNLLDVHDF	VPESVESVAE	FEPFSPDSS	YSIQAPEEKD	FSKEPPVLP	233
StGAL83	LPCEVDETGV	VFNLLDVNDN	VPENLESVAE	FEAPPSPDSS	YQAQLLVED	FAKEPVAVPP	225
Mtbeta1	LPYVADEMGN	VCNLLDVNDY	VPENPESVSE	FEAPPSPSS	YQQAYPABED	FAKEPMAVPS	212
Atbeta1	LPFVADEVGN	VCNLLDVHNE	VPENPESIVE	FEAPPSPDHS	YQQLPAABED	FAKEPLAVPP	222
Mtb2	LPWARDDAAN	TYNLLDLQDS	VPEDLGSISS	FEPKSPDSS	YNNLHLSSED	FAKEPPLVPP	221
Atbeta2	LPPLARDAGN	TFNLLDLQDY	VPEDIQSISG	FEPQSPENS	YSNLLLGAED	YSKEPPVPP	223
Atbeta3	TMITWCHGGK	EIAVEGSDWN	WKTTRSLQRS	GKDFTIMKVL	PSCVYBYRFI	VDGQWRHAPD	163
Atbeta3	-----	-----MNSQNP	DDHEDTTVVG	FEPVSPVSS	YNNVYSTED	ETRDPPAVPP	46
Zmbeta1	QLHLGVLNS-	-QNSEESCA-	-RPQHIVLNH	LFIEKGGWAH	PLVALGLTHR	FESKYVTIVL	295
Osbeta1	QLHLGVLNS-	-QNSDESC--	-RPQHIVLNH	LFIEKGGWAH	PLVALGLTHR	FESKYVTIVL	288
StGAL83	QLHLTVLGS-	-ENSEEAPSS	PKPQHVVLNH	LFIEKGGWASQ	SVVALGLTHR	FOSKYVTIVL	283
Mtbeta1	QLHLTVLGM-	-ENADSGPSS	-KPQHVVLNH	VFIEKNMASK	SVVAMGVTHR	FOSKYVTIVL	269
Atbeta1	QLHLTVLGG--	--TTBETAIA	TKPQHVVLNH	VFIEQGWTPQ	SVVALGLTHR	FESKYVTIVL	278
Mtb2	FMQATLLNVP	SANMEFQPLV	SRPQHVVLNH	LYMQKGGKSSP	SVVALGSTR	FVAKYVTIVM	281
Atbeta2	HLQMTLLNLP	AANPDIPSPL	PRPQHVVLNH	LYMQKGGKSGP	SVVALGSTR	FLAKYVTIVL	283
Atbeta3	HLQHSLLG--	--NQSMELA	YAPQNVVLNH	LYLENRDAPR	SVVALGFSHR	FRTKFTIVVI	102
Zmbeta1	YKPIER----	--	301				
Osbeta1	YKPIER----	--	294				
StGAL83	YKPIKR----	--	289				
Mtbeta1	YKPIKR----	--	275				
Atbeta1	YKPIER----	--	284				
Mtb2	YKSLOR----	--	287				
Atbeta2	YKSLOR----	--	289				
Atbeta3	YKPVORRGS	NV	107				

Figura 30. Alineamiento CLUSTALW de las secuencias aminoacídicas deducidas de Zmbeta1, Osbeta1 de *O. sativa*, StGAL83 (AJ012215) de *S. tuberosum*, Mtbeta1 (AY247271) y Mtbeta2 (AY247272) de *M. truncatula* y Atbeta1 (AJ132315), Atbeta2 (AJ132316) y Atbeta3 (AF491295), de *A. thaliana*. En azul se marca el dominio KIS y en amarillo el dominio ASC según Jiang and Carlson (1997).

Zm β 1 presenta una similitud del 73% con AtAKIN β 1 y un 68% con AtAKIN β 2, siendo ésta mayor en el extremo C-terminal. En el alineamiento se incluye también la subunidad atípica AtAKIN beta3, que carece de gran parte del dominio KIS. Como en el caso de humanos y levaduras, el extremo N-terminal es más divergente a nivel de secuencia. El análisis filogenético (figura 31) muestra la diversidad en la existencia de subunidades β vegetales y sitúa a Zm β 1 más cercana al grupo en que se encuentra AtAKIN β 1.

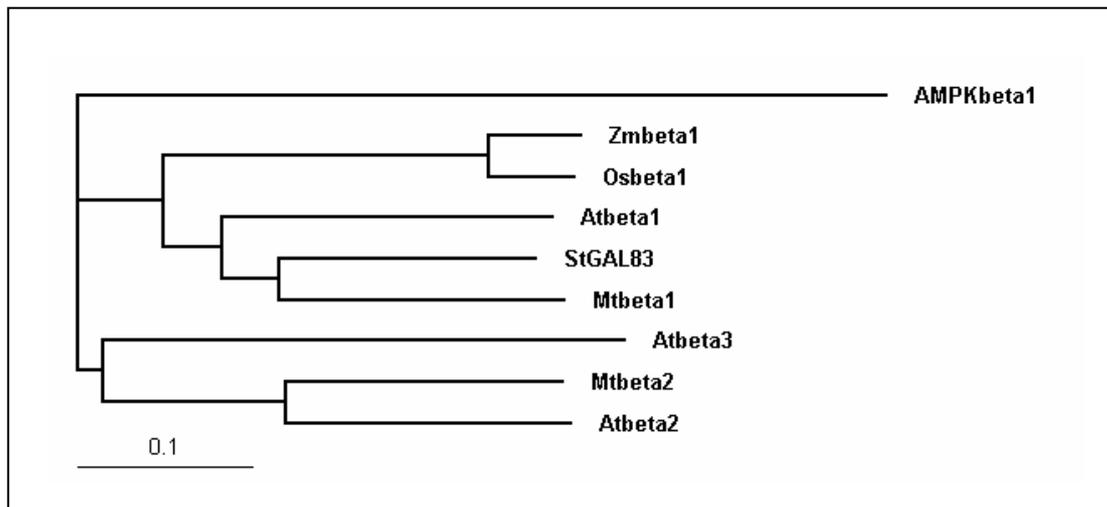


Figura 31. Análisis filogenético entre las proteínas β vegetales anteriormente alineadas. Se incluye además la subunidad AMPK β 1 de mamíferos.

2.1.3 Identificación y aislamiento de clones codificantes para subunidades γ del complejo SnRK1

Una estrategia similar se ha llevado a cabo para la identificación de subunidades tipo γ de maíz, pero debido a la diversidad y divergencia de estas subunidades en plantas, se ha realizado el TBLASTn utilizando diferentes subunidades γ como AtAKIN((AJ132317) de *A. thaliana*, MtAKIN((AY247269) de *M. truncatula* o Pv42 (U40713) de *P. vulgaris*. Se identificaron 2 ESTs de maíz (AY105248 y AY108174) correspondientes a dos cDNAs completos. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la región codificante y se aislaron dos cDNAs: Zm γ 1 y Zm γ 2. La secuencia aminoacídica deducida es de 225 y 314 aminoácidos con un PM teórico de 47.75 y 33.3 kDa para Zm γ 1 y Zm γ 2, respectivamente. Las subunidades AKIN γ se han dividido en tres grupos en plantas (Bradford et al., 2003). El primer grupo se distingue por la

presencia del dominio KIS, y los dos restantes por su homología de secuencia con SNF4 y su capacidad de complementar al mutante *snf4*. Las dos subunidades, Zmy1 y Zmy2, presentan mayor homología con el grupo en que se encuentran las subunidades γ más divergentes entre ellas. Se ha descrito que algunas subunidades de este grupo han perdido la capacidad de complementación del mutante *snf4* de levadura. Zmy1 y Zmy2 presentan entre ellas una similitud de secuencia del 60%. Zmy1 presenta mayor homología con las subunidades de *A.thaliana* (58%) o *M.truncatula* (80%) que Zmy2 (44 y 59% para las mismas subunidades). Ambas subunidades presentan los dominios CBS característicos de estas proteínas, importantes en la unión de ATP (Day et al., 2007). En la figura 32 se muestra un alineamiento CLUSTALW de Zmy1 y Zmy2 con las subunidades AKIN γ de *A. thaliana* y *M. truncatula*. Se marca con una línea negra los dominios CBS.

Zmy1	-----MESP	RS-----	---	PEAEIGH	RVEDLWEVAE	PQLSPSEKLN	SCFEDIPVAS	43
MtAKIN γ	MAMATMREMP	RS-----	---	PEAKLGM	RVEDLWDVDE	AQLSPNDKLN	ACFESIPVSA	49
Zmy2	-----MDQP	EE-----N	---	PEPESCDA	YFEATQSKKK	LPLTLOESLT	AAPAQIPVSS	45
AtAKIN γ	MATVPEIKIM	RSESLGHRSD	VSS	PEAKLGM	RVEDLWDEQK	PQLSPNEKLN	ACFESIPVSA	60
Zm β γ	-----	-----	---	-----	-----	-----	YDLLPDS	174
<hr/>								
Zmy1	FFRTHPSQVI	EIPSDASLAE	TVEILSKNKI	LSAPLRNVEA	PEDASWMDKY	IGIVEFAGIA	103	
MtAKIN γ	FPLPAKNQEI	EIKSDATLAE	AVKILARHNI	LSAPVVDVDA	PEDATWIDRY	IGIVEFAGIV	109	
Zmy2	FPEVPAGRVI	EIPGDTSVID	AVRTLSEONI	RAAPVLNPEP	GAPTDWQGRY	LGVIDYSATI	105	
AtAKIN γ	FELSSDSQDI	EIRSDTSLAE	AVQTLSEKFKV	LSAPVVDVDA	PEDASWIDRY	IGIVEFPGIV	120	
Zm β γ	-----GKVI	ALDINLQVQ	SFHLHEGCI	PVAPLWD---	-----SFRQF	VGLLSPIDFI	228	
<hr/>								
Zmy1	MWLLSQSDAA	VNGTVGSGPG	SP-----	-----	-----VSSLVS	RLGSFTFRRT	141	
MtAKIN γ	VWILLHQSEPP	S-----PR	SPST-----	-----	-----PTSASATA	AANGNTFARE	145	
Zmy2	LWVLENAELA	AVALSAASAT	AAGVGMGAVG	AVGVAALGTT	GPAAVAGLTA	AAIGASVAGG	165	
AtAKIN γ	VWILLHQLEPP	S-----PR	SP-----	-----	-----AVA	ASNGFSHDFT	148	
Zm β γ	LILLRELETHG	S-----	-----	-----	-----N-LTED	QLTHTTISAW	254	
<hr/>								
Zmy1	SSGRLETATD	SESDETTSVG	GSFFELLTSS	EFYKNTKVQD	ISGSFRWAPF	LALQTSDFL	201	
MtAKIN γ	----LEALGL	GSAATTS---	GNFFEDLTSS	ELYKNTKVQD	ISGSFRWAPF	LALERSNSFL	198	
Zmy2	LTAEKGVAKD	GLTAADHLG-	EDFYKVLQQ	EPFRSTTVRS	IVESYRWSPF	VPITLDTSMI	224	
AtAKIN γ	----TVLDN	GDSAVTS---	GNFFEVLTSS	ELYKNTKVRD	ISGSFRWAPF	LALQKENSFL	201	
Zm β γ	KEAKRQTCGR	NDGQWRA---	HQHLVHATPY	ESLRDIIVKIL	LLNDISTVPE	IYSSSSDGSF	311	
<hr/>								
Zmy1	TMLLLLSKYR	MKSLPVVEVG	GDKIEIITIQ	SSVHMLAEC	VGLSWFENWG	TKKLSSELGLP	261	
MtAKIN γ	TMLLLLSKYK	MKSVPVVDLG	SGTIDNIITQ	PAVHMLAEC	AGLOWFESWG	TKKLSDVGLP	258	
Zmy2	TVLLLLSKYR	LRNVPVLEPE	KPIILNFITQ	TGVVKGLOQC	KGRDWFYIS	ALPLSDLGLP	284	
AtAKIN γ	TMLLLLSKYK	MKSIPVVDLG	VAKIENIITQ	SGVHMLAEC	AGLWFEDWG	IKKLSSEVGLP	261	
Zm β γ	PQLLHLAS--	LS-----GIL	KCIERYFKNS	TGNLPILNCP	VCSIPLGSW-	---VPKIGDP	360	
<hr/>								
Zmy1	VMKPSKLVKV	SEDQPVKAF	QLMREKGVGG	LPVMDTSGAN	AIGNISIRDV	QYLLTAPKIY	321	
MtAKIN γ	LVTPKQIIKV	YEDEPVLQAF	KEMRKRKRVGG	VPVTKRGCTT	AVGNISLRDV	QFLLTAPETIY	318	
Zmy2	FMSIDEVITV	NSDDLLEAF	KCMKDKKIGG	VPVVEGPKRK	LVGSVSIRDI	RFLLLRPNLF	344	
AtAKIN γ	IMSKDHIKI	YEDEPVLQAF	KLMRRKRIGG	IPVIERNSEK	PVGNISLRDV	QFLLTAPETIY	321	
Zm β γ	NSRP--LAML	RPNASISSAL	NMLVQAGVSS	IPIVDEN-DS	LLDTYSRSDI	T-ALAKAKVY	416	



Figura 32. Alineamiento CLUSTALW de Zmγ1 y Zmγ2 con otras subunidades vegetales con dominio γ: MtAKINγ de *M. truncatula* (AY247269), AtAKINγ de *A. thaliana* (AF439826) y el dominio C-terminal de ZmAKINβγ de *Zea mays* (AF276085)

Se han utilizado secuencias de subunidades γ vegetales de los tres grupos existentes, para realizar un estudio filogenético y situar a las dos subunidades γ aisladas de maíz. En el caso de las subunidades βγ, se ha utilizado únicamente el dominio γ-like. Como puede observarse en la figura 33, las subunidades Zmγ son más homólogas a las subunidades AtAKINγ y MtAKINγ, subunidades más divergentes, a nivel de secuencia, con SNF4.

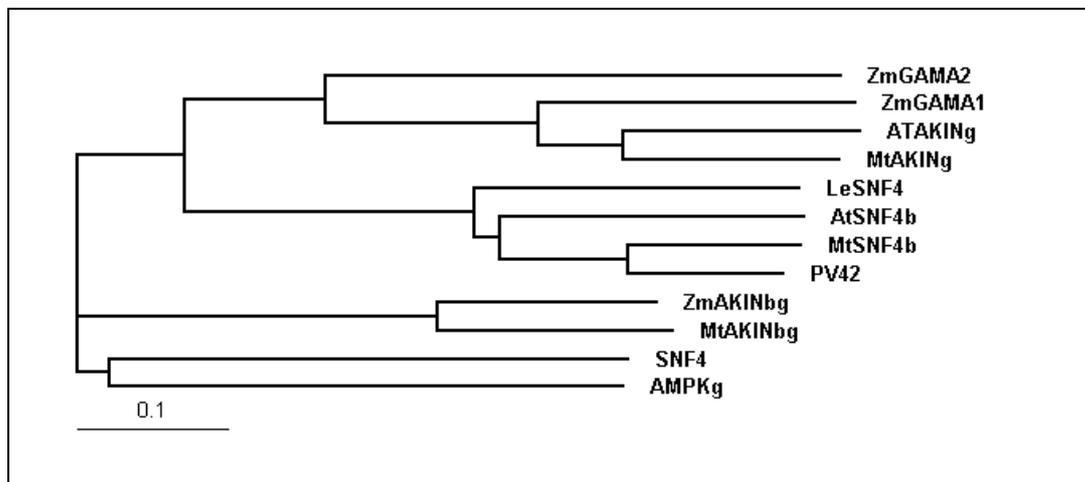


Figura 33. Árbol filogenético de subunidades del tipo γ. Además de las proteínas alineadas en la figura anterior, se incluyen: LeSNF4 de *L. esculentum*, MtSNF4b de *Medicago truncatula*, Pv42 de *V. fava*, SNF4 de *S. cerevisiae* y AMPKγ de *H. sapiens*.

2.2 Estudio de la expresión de las subunidades ZmSnRK1

Se ha estudiado la expresión de las subunidades catalíticas y la subunidad Zm β 1 durante la maduración de la semilla y ante diferentes situaciones de estrés ambiental en plántulas de 5 días. A partir de 8 μ g RNA de granos de maíz de 7, 13, 30 y 60 días después de la polinización (dap) y durante la germinación en H₂O a las 6, 24 y 48 horas se realizó análisis de expresión por northern (figura 34). Las sondas utilizadas fueron: para ZmSNRK1b, la región del dominio regulador más 200pb de la zona 3'UTR; para ZmSnRK1a la región 3'UTR y para Zm β 1 se utilizó el cDNA codificante entero. Los transcritos de las subunidades catalíticas se acumulan más en semilla durante los primeros estadios del desarrollo, siendo la expresión nula en semilla madura. Cuando las semillas se incuban en H₂O, se induce la expresión de ZmSNRK1a y ZmSnRK1b. Este patrón de expresión está relacionado con tejidos con una alta actividad metabólica. Los niveles de expresión de ambas subunidades catalíticas son mayores en grano que en tejido vegetativo y superiores en raíz que en hoja. La expresión de Zm β 1 es constitutiva en las condiciones analizadas.

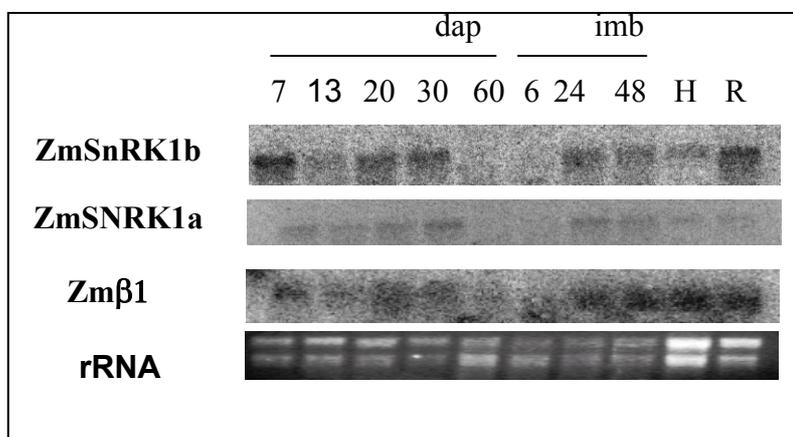


Figura 34. Estudio de la expresión de ZmSNRK1a, ZmSnRK1b y Zm β 1 durante el desarrollo del grano, la germinación y en hoja y raíz de plántulas de 5 días. dap: días después de la polinización; h imb: horas de germinación en H₂O; H: hoja; R: raíz.

Se realizaron también experimentos de privación de azúcares en qué, después de someter las plantas a un período de oscuridad de 5h con el objetivo de disminuir los niveles internos de azúcar, se incubaron 20h en medios diferentes: H₂O; 0.5xMS; 0.3M glucosa en 0.5xMS y 0.3M sacarosa en 0.5xMS. Las plantas crecidas en 0.5x MS se sometieron a un período de oscuridad de 2h, recogiendo muestras de hoja a los 30' y 2h (oscuridad/ luz) tal como se indica en la figura 35. A partir de 5 μ g de RNA se llevaron a cabo experimentos de northern hibridando con el cDNA de Zm β 1. Para las

subunidades catalíticas, debido a su menor expresión en hoja, se analizaron los transcritos mediante RT-PCR (figura 36)

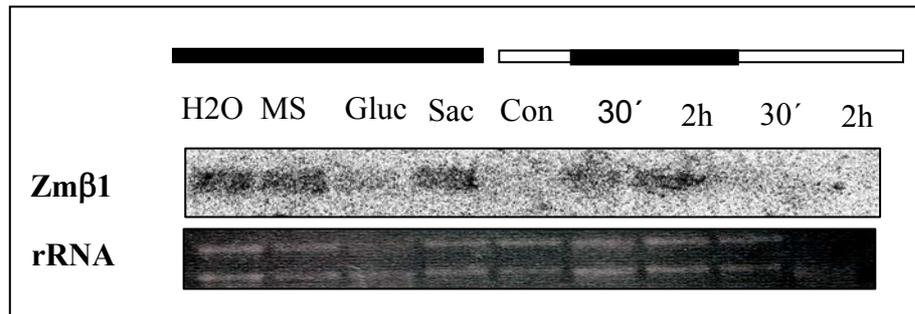


Figura 35. Análisis northern del patrón de expresión en hoja de Zm β 1, en plantas sometidas a un período de oscuridad de 5h e incubadas durante 20h en diferentes medios, o a diferentes tiempos de luz/oscuridad. Las cajas negras indican períodos de oscuridad y las cajas blancas de luz.

El mRNA de Zm β 1 se acumula en hojas de plantas sometidas a un período de oscuridad de 24h, independientemente del medio en que se encuentren. La respuesta a las condiciones de luz es rápida. Plantas crecidas en condiciones de 16h luz/8h oscuridad, tienen niveles no detectables en hojas expuestas a luz durante 6h (Con). Cuando estas plantas se someten a un período de oscuridad sus niveles aumentan rápidamente, detectándose ya expresión a los 30'. Este incremento en la expresión es reversible, también de una manera rápida, ya que cuando las plantas vuelven a exponerse a la luz, los niveles de transcrito disminuyen a los 30' de exposición. Estos resultados sugieren que Zm β 1 podría estar participando en procesos metabólicos regulados por luz. Para el estudio de la expresión de las subunidades catalíticas, debido a su menor expresión en hoja, se procedió al análisis por RT-PCR semicuantitativa (figura 36). No se observan diferencias para ninguno de estos genes, ante cambio de luz, o según la presencia o ausencia de glucosa en el medio

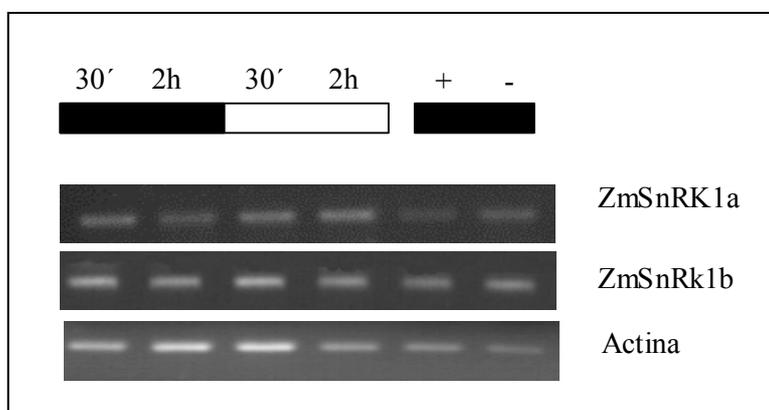


Figura 36. Análisis mediante RT-PCR de la expresión de ZmSnRK1a y ZmSnRK1b en hoja, en condiciones de luz/oscuridad (cajas blancas/negras) y en presencia o ausencia de glucosa (+/-)

2.3 Estudio funcional en levadura de las subunidades ZmSnRK1

En levadura, tanto la subunidad catalítica SNF1 como la subunidad reguladora SNF4, son necesarias en ausencia de glucosa para la activación de genes necesarios para el metabolismo de azúcares. Con el objetivo de determinar si las subunidades aisladas conservan también una homología funcional con las subunidades de levadura, se realizaron estudios de complementación en cepas de *S.cerevisiae* que presentan una deleción en el gen SNF1 (*snf1m*) o en SNF4 (*snf4m*). Ambas cepas se caracterizan por su incapacidad para crecer en un medio con una fuente de carbono alternativa a la glucosa. Los cDNAs de ZmSnRK1a, Zmy1 y Zmy2 se clonaron en el vector de expresión en levaduras PNEV, el cDNA de ZmSnRK1b en el vector PYES2 y se transformaron en las cepas mutantes *snf1m* y *snf4m*. Como se muestra en la figura 37, la cepa mutante de SNF1 es capaz de crecer, aunque de forma más lenta que la cepa salvaje, en un medio rico en glucosa (lo mismo ocurre para *snf4m* aunque no se muestra), pero no en un medio con una fuente de carbono alternativo como es la galactosa o el glicerol. Sin embargo, cuando ZmSnRK1b o ZmSnRK1a se sobreexpresan en estas cepas mutantes, son capaces de restablecer el crecimiento. La cepa *snf4m* presenta cierto crecimiento residual en galactosa y por ello se muestra la complementación en un medio más restrictivo como es el glicerol. Estos resultados demuestran que las subunidades de maíz son homólogos funcionales de SNF1 y probablemente están implicadas en plantas, en vías metabólicas similares a las vías reguladas por la proteína SNF1 de levadura.

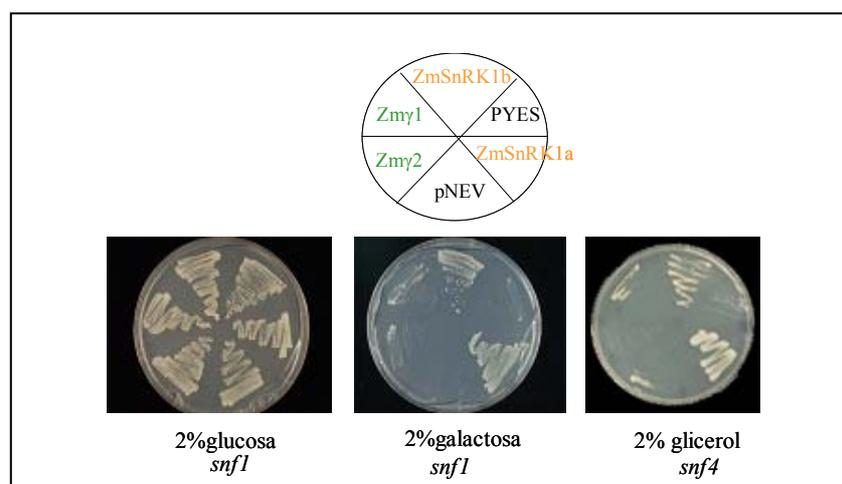


Figura 37. Complementación de las cepas *snf1m* y *snf4m* con las subunidades ZmSnRK1b, ZmSnRK1a, Zmy1, Zmy2 y los vectores vacíos pYES2 y PNEV. Los transformantes se seleccionaron inicialmente en medio SC (-URA) y posteriormente se pasaron a medio restrictivo (2% galactosa o 2% glicerol).

Además, la complementación de *snf4* con las subunidades catalíticas ZmSnRK1a y ZmSnRK1b, sugiere que podría funcionar independientemente de la subunidad reguladora. Por otra parte, ninguna de las subunidades Zmy aisladas es capaz de complementar al mutante *snf4m*.

2.4 Análisis de interacciones entre subunidades mediante ensayos de doble híbrido en levadura.

Las interacciones entre las diferentes subunidades del complejo SnRK1 se realizaron en levadura mediante ensayos de doble híbrido. Para ello, los cDNAs de las diferentes subunidades aisladas se clonaron en los vectores de expresión en levadura PGAD424 o PGBT9/PGBKT7 en fusión con el dominio de activación GAL4 (AD) o el dominio de unión a DNA (BD), respectivamente. Combinaciones entre las diferentes subunidades, así como el dominio regulador de ZmSnRK1b (332-509), el dominio KIS (1-214) y el dominio γ (154-455) de la subunidad ZmAKIN $\beta\gamma$, se transformaron en la cepa de *S.cerevisiae* AH109. Se seleccionaron los transformantes en medio selectivo para los dos plásmidos (-LT) y posteriormente se pasaron a medio selectivo para la interacción (-HLTA) en presencia (+) y ausencia (-) de glucosa (utilizando como fuente de carbono 2% galactosa, etanol y glicerol). En la tabla 2 se presentan los resultados de estas interacciones. No se pudieron realizar las interacciones con los clones ZmAKIN $\beta\gamma$, Zm β 1 y Zmy2, fusionados al dominio de unión a DNA(BD) ya que se producía autoactivación.

BD \ AD	ZmAKIN $\beta\gamma$		Zm $\beta\gamma\Delta\gamma$ (1-214)		Zm $\beta\gamma\Delta K$		Zm β 1		Zmy1		Zmy2		AtAKIN β 2	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
ZmSnRK1b	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	+++
ZmSnRK1a	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	+++
Zmy1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	+	++
AtAKIN11	-	++	-	-	+	++	++	++	-	-	-	-	+++	+++
RDb	++	++	-	-	+	+	++	++	-	-	-	-	+++	+++

Tabla 2. Resumen de las interacciones obtenidas en experimentos de doble híbrido utilizando la cepa AH109. Las subunidades de maíz ZmSnRK1a, ZmSnRK1b, su dominio regulador 332-509(RDb), Zmy1 y la subunidad catalítica AtAKIN11 de *A.thaliana* se encuentran fusionadas al dominio de unión a DNA (BD). Éstas se cotransformaron con ZmAKIN $\beta\gamma$, su dominio KIS (Zm $\beta\gamma\Delta\gamma$, 1-214), su dominio γ (Zm $\beta\gamma\Delta K$), Zm β 1, Zmy1, Zmy2 o AtAKIN β 2 de *A.thaliana*. La interacción se mide por su capacidad para crecer en medio selectivo (-HLTA), en

presencia (+) o ausencia de glucosa (-) y se indica según: -, negativa; +, débil; ++, positiva, +++ muy fuerte; ND: no determinada.

Contrariamente a lo esperado, no se detectó una interacción entre la subunidad ZmAKIN $\beta\gamma$ y las subunidades catalíticas de maíz, ni tampoco con las subunidades reguladoras Zm γ . Ambas subunidades catalíticas interaccionan únicamente con las subunidades β , siendo la interacción mucho más fuerte para el caso de AtAKIN β 2 de *A. thaliana*. Sin embargo, cuando se utiliza el dominio regulador de ZmSNRK1b, que por homología de secuencia es el que se ha descrito en *A. thaliana* como responsable de la interacción con la subunidad ZmAKIN $\beta\gamma$ (Lumbreras et al., 2001) sí que se produce interacción con ZmAKIN $\beta\gamma$ y, además, la interacción con la subunidad Zm β 1 es más fuerte, lo cual indica que quizás en levadura las subunidades no adquieren la conformación o se da la condición adecuada para que haya una interacción entre subunidades catalíticas y otras subunidades.

2.5 Expresión de las subunidades catalíticas ZmSnRK1 en E.coli y ensayos de actividad.

Para confirmar que ZmSnRK1a y ZmSnRK1b codifican para formas activas de proteínas quinasas se decidió expresar estas proteínas en *E.coli* para posteriormente poder realizar ensayos de actividad. Debido a la insolubilidad de estas proteínas expresadas en bacteria se siguieron estrategias de clonación en diferentes vectores, con varios epítomos y condiciones de expresión y purificación que se detallan en la figura 38. Como primera aproximación se decidió clonar la subunidad ZmSnRK1b en el vector de expresión pet28a, de manera que nuestra proteína quedara fusionada a una cola de histidinas para la posterior purificación por columnas de níquel. La proteína expresada se encontraba en cuerpos de inclusión por lo que se pasó a un nuevo vector (pet 201) que además de tener la cola de histidinas, incorporaba la proteína tioredoxina, que se ha descrito que mejora la solubilidad de las proteínas a las que se fusiona (Jonsdottir et al., 2004). De esta manera, clonamos las subunidades ZmSnRK1a y ZmSnRK1b fusionadas en su extremo N-terminal a la tioredoxina y en el extremo C-terminal a una cola de 6 histidinas. De nuevo, las proteínas se acumulaban en cuerpos de inclusión (P) y además la poca proteína que se obtenía eluía junto a dos proteínas contaminantes de *E.coli*, una de ellas de igual tamaño (figura 38a). La inducción a una O.D mayor y una temperatura

más baja (hasta 20°C), no mejoraba significativamente la expresión en la fracción soluble.

Para solventar estos problemas se clonó ZmSNRk1b en el vector pGEX4T-1, fusionada en el N-terminal a la proteína GST. A pesar de que la proteína de fusión continuaba encontrándose principalmente en cuerpos de inclusión, se consiguió purificar parte de ésta, pero con el inconveniente de tener una proteína altamente inestable y con muchos degradados en la fracción parcialmente purificada (figura 38b). Finalmente se decidió realizar una construcción parcial que incorporaba el dominio quinasa, más parte del dominio regulador, concretamente el dominio denominado UBA. Como se observa en la figura 38b, la solubilidad de la proteína mejoraba significativamente y se pudo purificar el dominio quinasa fusionado a GST mediante columnas Glutation Sepharosa 4B, tal como se indica en el apartado Material y Métodos. El dominio quinasa se eluyó en 20mM Tris pH:8, 20mM glutatión, 0.01% Tritón X-100 y posteriormente se dializó con tampón fosfato 50mM. Para su conservación a -20°C se añadió glicerol hasta un 50%.

A partir de 10 µl de fracción purificada del dominio quinasa se realizaron ensayos de actividad utilizando como sustrato el péptido SAMS (HMRSAMS*GLHVKRR) que contiene una secuencia derivada del consenso de fosforilación de la Acetil-CoA Carboxilasa, sustrato conocido de AMPK. La secuencia original contiene dos Ser fosforilables: Ser 77, fosforilable por PKA, y Ser 79 fosforilable por AMPK. En el péptido sintético la Ser 77 está mutada por una Ala, de manera que el consenso se vuelve específico para AMPK. El ensayo de actividad se ha realizado en un volumen de 40µl en un tampón 20mM Tris pH:8, 0.1mM SAMS, 0.1mM ATP y con 15mM MgCl₂ o 5mM MnCl₂. Para iniciar la reacción se añadió 0.75µl de γ-[³³P]-ATP y se incubó 45' a 30 °C. La mezcla de reacción se añadió a un papel Whatman p-81 y después de tres lavados con ácido fosfórico 75mM y un lavado en acetona se procedió al contaje en un contador de centelleo líquido (figura 39). La actividad se expresa en cpm. Los resultados muestran que el dominio quinasa de ZmSnRK1b es capaz de fosforilar el péptido SAMS y que presenta mayor actividad cuando se incuba en presencia de iones Mn²⁺. Cuando se utiliza Ca²⁺ como cofactor no se obtiene actividad SAMS.

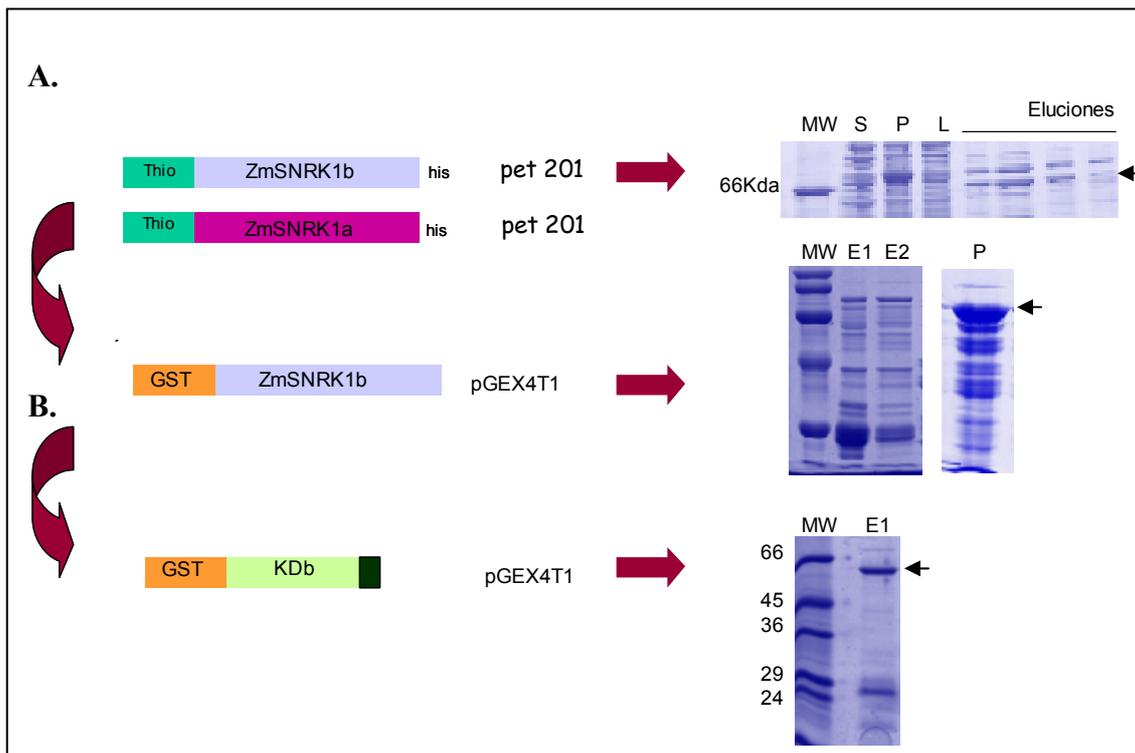


Figura 38. Estrategia seguida para la expresión de las subunidades catalíticas ZmSNRK1a y ZmSNRK1b, y el dominio quinasa de ZmSNRK1b (KDb). En la izquierda se representan esquemáticamente las diferentes construcciones generadas para la expresión en *E.coli*. En la derecha se muestran los geles de proteínas de las sobreexpresiones correspondientes. MW: marcador de peso molecular; S: fracción soluble; P: pellet; E1, E2: eluidos glutatión. Las flechas indican la proteína de fusión.

AMPK contiene una secuencia comprendida entre los aa 312-335, que funciona como dominio autoinhibidor, y que es además la responsable de la inestabilidad de la proteína cuando se expresada en bacteria o de manera transitoria en células de mamíferos (Pang et al., 2006) En levaduras el dominio inhibidor se había descrito entre los aas 392- 507 (Jiang and Carlson, 1997) y los únicos datos para las subunidades de plantas provienen de este mismo trabajo, donde se llevaron a cabo experimentos de doble híbrido con la subunidad de tabaco, NPK5, que determinaban la interacción entre el dominio quinasa y el dominio regulador a partir de los aa 332. Sin embargo, nuestros resultados de doble híbrido resultaron negativos para la interacción entre el dominio quinasa (1-331) y el dominio regulador (332-509). Para comprobar si la secuencia comprendida entre los aminoácidos 312-332, presente en la construcción del dominio quinasa, tanto para los experimentos de doble híbrido como de sobreexpresión, podía actuar como autoinhibidora, de manera similar a lo que ocurre en la proteína de humanos, se realizó una construcción más corta del dominio quinasa (1-303) fusionado a GST. Esta construcción se sobreexpresó y purificó en *E.coli* con el objetivo de comprobar si se obtenía una proteína con mayor actividad. Esta proteína no presenta un

aumento de actividad respecto a la proteína anteriormente descrita, lo cual indica que este dominio no es, al menos en ZmSnRK1b, el responsable de la autoinhibición.

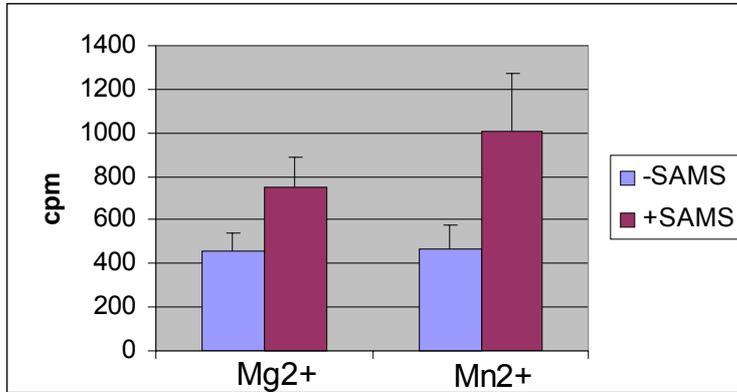


Figura 39. Fosforilación del péptido SAMS por la proteína de fusión GST-KDb en presencia de Mg²⁺ 15mM o Mn²⁺ 5mM. Los resultados son medias de al menos tres experimentos independientes.

2.6 Estudio de la localización subcelular de las proteínas ZmSnRK1a y ZmSnRK1b

El complejo SnRK1 interviene en procesos muy diferentes en las células vegetales similarmente a lo que ocurre en mamíferos y levaduras. SnRK1 está involucrado en procesos tan variados como regulación del metabolismo, fertilidad, organogénesis, senescencia, repuesta a patógenos, resistencia a sal o regulación de síntesis de compuestos de reserva como el almidón (Revisión Gissot et al, 2006). Tal versatilidad en funciones sugiere la existencia de complejos diferentes en composición y una distribución heterogénea en los compartimentos celulares. En levaduras, SNF1 presenta una localización nucleocitoplasmática dirigida por las subunidades beta y la fuente de carbono asequible (Vincent et al., 2001). En mamíferos las dos subunidades AMPK presentan una distribución subcelular diferente. AMPK α 1 se encuentra distribuida únicamente en citoplasma, mientras que AMPK α 2 se encuentra también en núcleo y forma en citoplasma un patrón punteado que no se ha correlacionado hasta el momento con ningún orgánulo (Salt et al., 1998). La subunidad AMPK β 1 se encuentra distribuida en citoplasma en un patrón punteado homogéneo provocado por las modificaciones postraduccionales de fosforilación y meristilación (Warden et al., 2001). En el momento de iniciar este trabajo no existían datos sobre la localización subcelular de subunidades SnRK1 vegetales. Para estudiar la localización subcelular de las dos quinasas identificadas se fusionó ZmSnRK1a y ZmSnRK1b en su extremo C-terminal a la proteína GFP y realizamos expresión transitoria en cebolla mediante biolística y análisis de imágenes con un microscopio confocal LeicaTC

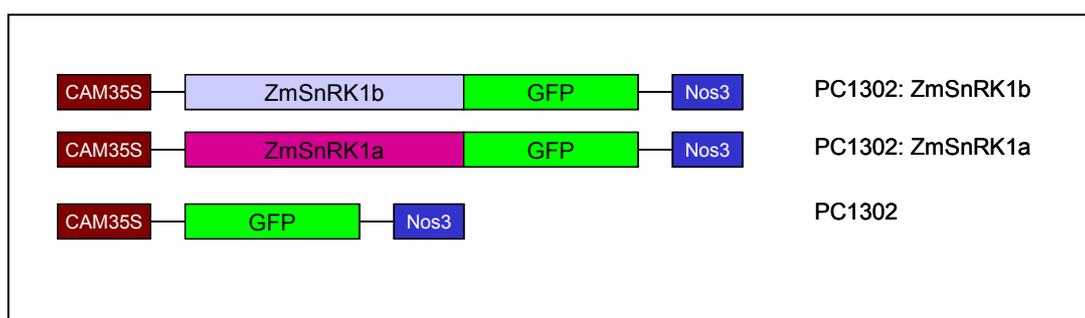


Figura 40. Construcciones utilizadas para la transformación transitoria de células epidermales de cebolla con las subunidades ZmSnRK1a y ZmSnRK1b

Cuando se transformaron las células de cebolla con la construcción PC1302:ZmSnRK1b se observó la proteína de fusión tanto en núcleo como en citosol al

cabo de 16h, y en algunas células podía observarse en los nucleolos (figura 41a.) Sin embargo, este patrón de distribución subcelular cambiaba al cabo del tiempo y a las 24h observamos un patrón punteado en el citoplasma y una acumulación menor de la proteína de fusión en el núcleo (figura 41b). Al transformar las células con la construcción PC1302:ZmSnRK1a se obtiene un patrón punteado similar al obtenido con ZmSnRk1b pero este puede observarse ya a las 16h. Por su función en el metabolismo oxidativo creímos que este patrón de las subunidades catalíticas podían corresponder con mitocondrias y para ello utilizamos el colorante específico Mitotrack. No conseguimos ver la doble tinción en células transformadas con ZmSnRK1b. En la Figura 42 se muestran imágenes de la localización de la proteína de fusión ZmSnRK1a-GFP y las mismas células teñidas con el colorante Mitotrack. A partir del patrón y la superposición de imágenes se observa que el patrón punteado no corresponde con mitocondrias.

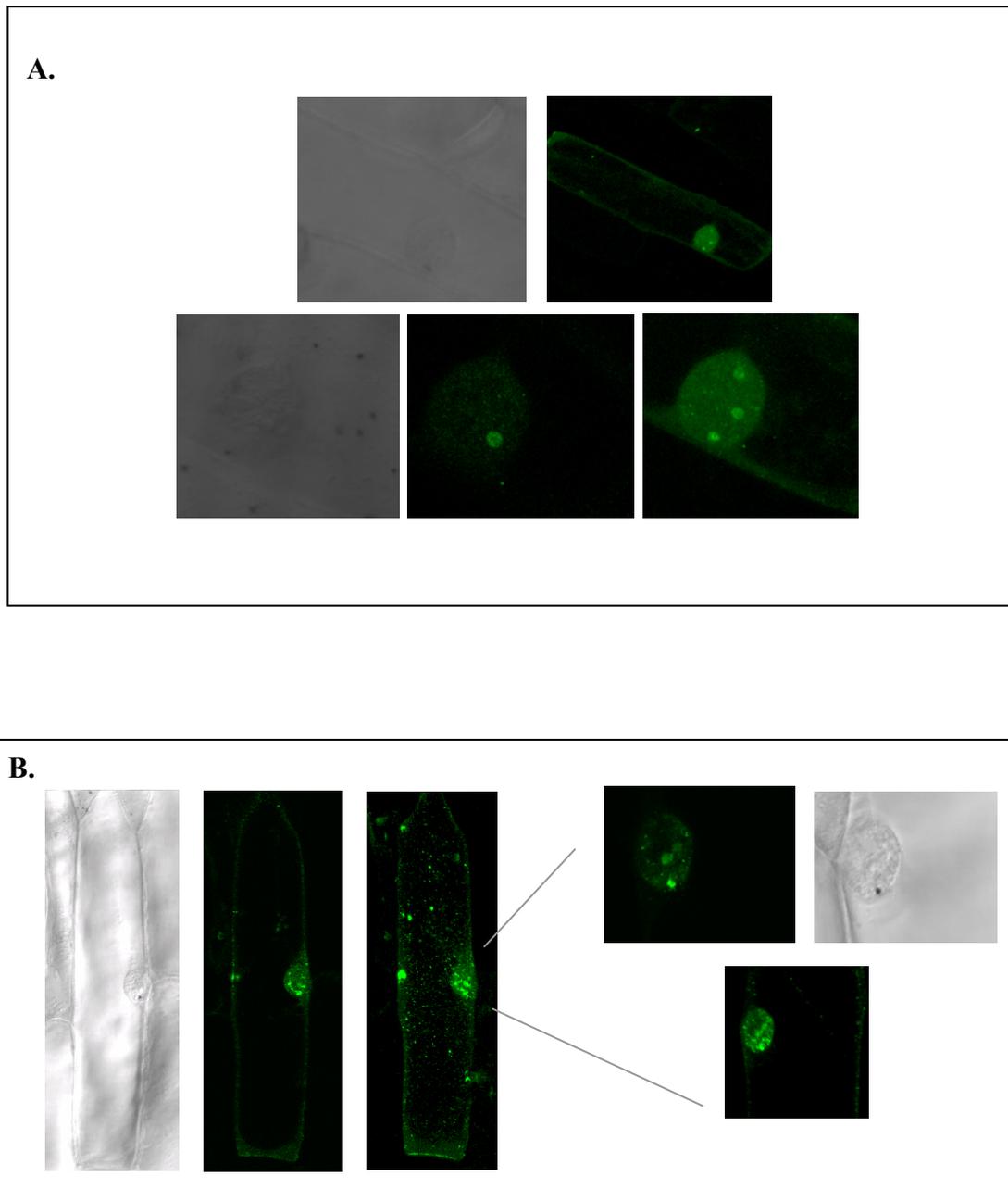


Figura 41. Imágenes de microscopía confocal de células de cebolla transformadas con la construcción ZmSnRK1b-GFP. **A:** Células observadas al cabo de 16h. Imágenes superiores: vista general de la célula (20X); imágenes inferiores: ampliación del núcleo (63x). **B:** Células observadas al cabo de 24h de la transformación. En la derecha, vista general de la célula (20x), en la izquierda detalle del núcleo (63x)

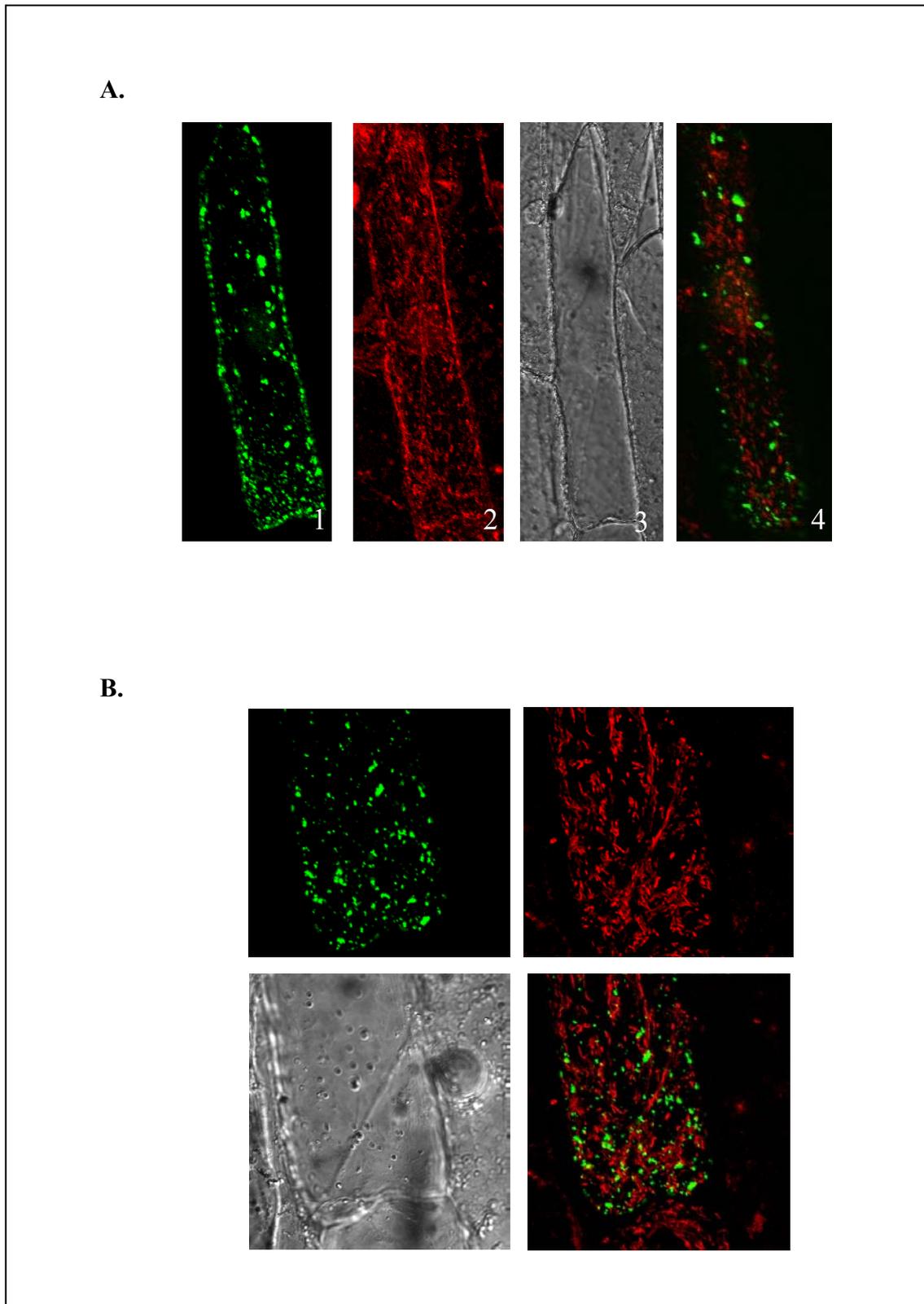


Figura 42. Imágenes de microscopía confocal de células transformadas con la construcción ZmSnRK1a-GFP **A.** (1) Proyección de célula transformada y teñida con el colorante Mitotracker (2). (3) Imagen de transmisión de la misma célula. (4) Superposición de fluorescencia en el mismo plano (ampliación 20x). **B:** Ampliación de las mismas células (63X)

2.7 Identificación de proteínas que interaccionan con ZmSnRK1b

Varios estudios han demostrado que diferentes complejos AMPK/SnRK1 pueden existir *in vivo*. En los últimos años se han descrito en varias especies vegetales, diferentes isoformas de cada una de las subunidades que forman el complejo. En *Medicago truncatula*, por ejemplo, se ha demostrado que transcritos de varias de las isoformas β y γ , se acumulan de manera diferencial en tejidos vegetativos y semillas, y su expresión se regula durante la germinación y la imposición de estrés (Buintik et al., 2003). Se han descrito interacciones entre las subunidades β y γ con las subunidades catalíticas del subgrupo a, pero hasta el momento no se han descrito interacciones con ninguna subunidad catalítica del subgrupo b. Experimentos de doble híbrido con las subunidades aisladas no apoyaban la hipótesis de que la quinasa ZmSnRK1b formase parte de un complejo trimérico, así que se decidió utilizar nuevamente la técnica del doble híbrido para identificar proteínas que interaccionaran con ZmSnRK1b, ya fueran homólogos a las subunidades del complejo, proteínas moduladoras o sustratos de la quinasa.

Para esta nueva aproximación se utilizó la proteína ZmSnRk1b fusionada al dominio de unión a DNA de la proteína GAL4(BD) en el vector pGBKT7. Se trata de la misma construcción que habíamos utilizado anteriormente y por tanto ya sabíamos que no presentaba autoactivación para la selección por crecimiento en medio selectivo -HLTA. Se rastreó una librería de embrión joven de maíz, cuyos cDNAs están clonados en las dianas EcoRI/XhoI del vector pACT2 que contiene el dominio de activación de la proteína GAL4. El sistema utilizado fue el MATCHMAKER 2-hybrid system de CLONTECH y el protocolo que se siguió se detalla en la figura 43. La cepa que se utilizó es AH109 de *S.cerevisiae*, que contiene como genes marcadores His3, Ade2 y LacZ. Como se muestra en la figura 43, el primer paso fue la transformación de ZmSnRK1b en la cepa de levadura AH109. Los transformantes se seleccionaron en medio SD-T y se inició un nuevo cultivo que se cotransformó con 0.4mg de DNA de la librería. La eficiencia de transformación se calculó mediante una serie de diluciones que se plaquearon en medio selectivo para los dos plásmidos (-LT). Se analizaron 526.000 clones independientes de los cuales 101 crecieron en placas -HLTA a los 8 días de la transformación. A partir de estos clones se realizó ensayo β -galactosidasa para

confirmar las interacciones (figura 44a). Cuando estos clones se pasaron a un medio – HLTA pero con un 2 % de glucosa se observa un crecimiento más débil (figura 44b).

De los clones positivos se extrajo el DNA plasmídico de la levadura y se transformó *E.coli*. La diferencia en la resistencia a antibiótico de los plásmidos pGBKT7 y pACT2 permite una fácil separación de los clones AD y BD. Por análisis de restricción se seleccionaron únicamente aquellos clones con un tamaño mayor a 300pb. Estos plásmidos se volvieron a retransformar en la cepa AH109 con la construcción ZmSnRK1b:BD. Finalmente, se confirmó la interacción con 37 clones que procedimos a secuenciar.

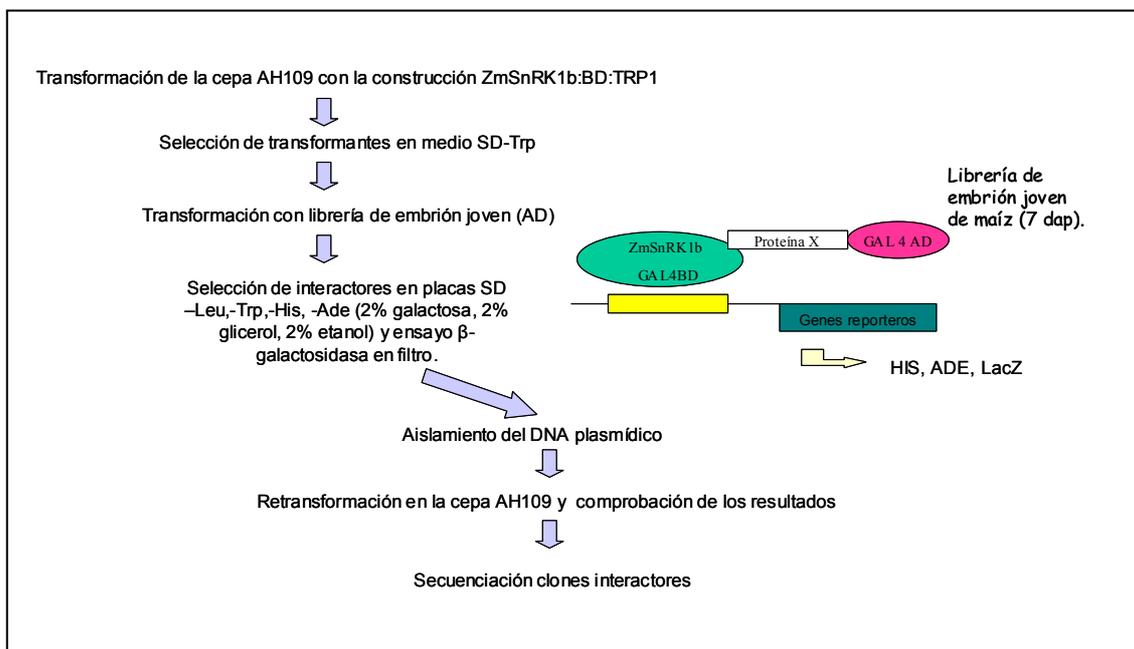


Figura 43. Resumen del proceso seguido en el rastreo de la librería de embrión joven de maíz con la proteína ZmSnRK1b:BD

Sorprendentemente en este escrutinio no se obtuvo ningún clon con homología a las subunidades del complejo. Sin embargo, entre los clones obtenidos se encontraban proteínas relacionadas con el metabolismo de la glucosa o con la subunidad de mamíferos AMPK, mucho más estudiada. Búsqueda bibliográfica confirmó que muchas de estas proteínas están fosforiladas en determinadas situaciones por quinasas desconocidas, y su interacción con ZmSNRK1b sugiere que esta familia de quinasas podría ser la responsable de estas fosforilaciones. Se escogieron algunos de estos clones para comprobar su interacción con la subunidad ZmSnRk1a y determinar la especificidad con los posibles “sustratos” o *partners* identificados.

En la tabla 3 se muestra la información obtenida para cada uno de estos clones positivos, y se divide en grupos funcionales, según la bibliografía encontrada o el análisis con programas, como SMART o Scanprosite, que ha proporcionado información sobre sus dominios funcionales.

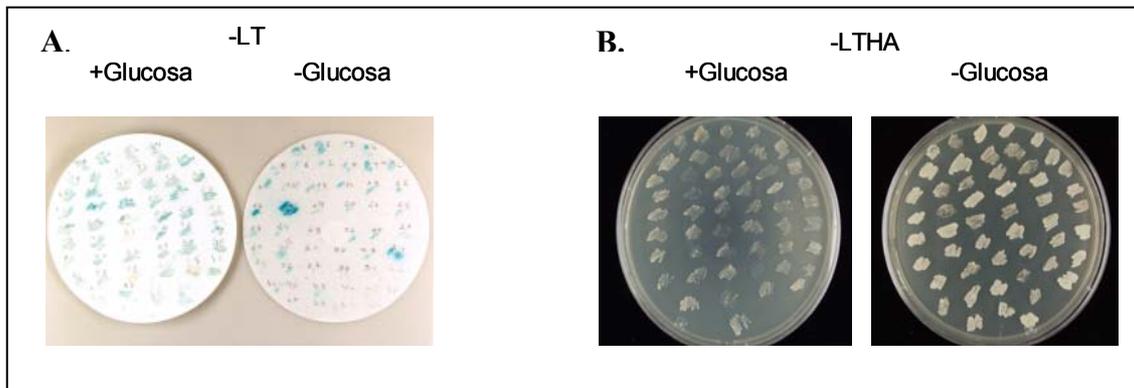


Figura 44. Ensayo β -galactosidasa en filtro de los clones inicialmente seleccionados (A), y comparación del crecimiento en medio con 2% glucosa y 2% galactosa, etanol y glicerol (B)

Varios de los clones no presentaban similitud con proteínas conocidas y algunos de ellos solo presentaban homología con ESTs de maíz. Como se puede observar en la tabla 3, los clones aislados pertenecen a grupos muy diferentes por lo que respecta a su función. Se han aislado factores de transcripción y unión a RNA, cuya interacción en algunos casos, como el del clon 7 o 16, es dependiente de la presencia de glucosa en el medio, lo que indica que ZmSnRK1b podría estar regulando la transcripción a través de estos factores, en función de la disponibilidad de nutrientes, tal y como ocurre en levadura (Schuller, 2003). Dentro del grupo de metabolismo de ácidos nucleicos cabe destacar el clon 23 que a pesar de ser parcial, tiene una elevada homología de secuencia con la proteína UPF1, descrita como una RNA helicasa involucrada en procesos de *non sense-mediated mRNA decay*. Recientemente, se ha descrito en arábidopsis que mutaciones en UPF1 causan un fenotipo hipersensible a glucosa y lo implican en la expresión de genes inducibles por azúcares (Yoine et al, 2006). Por otra parte, en mamíferos se ha descrito que esta proteína está altamente fosforilada y su actividad esta modulada por esta modificación postraduccional regulada por la fosfatasa 2 A, cuya relación con SnRK1 ya ha sido demostrada tanto por interacción a través de la subunidad reguladora (Gimeno-Alcániz and Sanz, 2003), como por la defosforilación de los mismos sustratos (Douglas et al., 1997; MacKintosh, 1992). La interacción de PP2A con ZmSnRK1b sugiere que en plantas esta fosfatasa está también relacionada con el

complejo SnRK1. Aunque la interacción del clon 62 con la subunidad ZmSnRK1a ha resultado negativa, los resultados obtenidos no descartan que esté interaccionando con otra subunidad PP2A, debido a la diversidad de subunidades reguladoras que han sido descritas en organismos como *A. thaliana* (Farkas et al, 2007).

También se han identificado tres factores implicados en el inicio de la traducción (clones 76, 90 y 57), que codifican respectivamente, para una proteína de la subunidad ribosomal 40S, el factor de elongación eEF2, y un componente del complejo de inicio de la traducción, eIF3h). En mamíferos AMPK se ha relacionado directamente con el control de la síntesis proteica, a través de la fosforilación de eEF2 (Hong-Brown et al, 2007)

En el segundo grupo se han incluido aquellos clones que presentaban homología con proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y lípidos como son la piruvato quinasa, el enzima málico dependiente de NADP y una proteína homóloga a las proteínas de unión a oxisteroles. Todos estos clones son parciales y los dos primeros de localización plastídica. Los clones parciales 17, 19, 26, 61, 93 corresponden a la forma no fotosintética del enzima málico dependiente de NADP, enzima específico de plantas C4 con una función en el metabolismo de carbohidratos (Drincovich et al., 2001). Inicialmente nos interesamos en este clon por su interacción fuerte y específica con ZmSnRK1b sin embargo lo descartamos al no producirse interacción con el clon entero.

El tercer grupo incluye proteínas del metabolismo oxidativo como la subunidad de 18kDa del complejo I mitocondrial y una superóxido dependiente de manganeso (MnSOD) que se decidió incluir en este grupo por su localización mitocondrial y su papel ante situaciones de estrés oxidativo.

En un último grupo se han incluido aquellos clones que no presentan homología con proteínas de función conocida, o con un papel diferente al de los grupos anteriores, como es el caso de los transportadores de membrana.

Clon	Interacción en Gluc	Interacción con ZmSnRK1a	Homología a...	Nº Acceso/Organismo
Metabolismo del DNA y RNA				
7	+	-	GATA zinc finger. Contiene dominio CCT	BAD13061/ <i>O.Sativa</i>
8	+	+	Proteína de unión a RNA. Contiene motivo RRM	AY103907/ <i>Zea mays</i>
9	+	+	Proteína de unión a RNA. Dominio KH1	AY104046/ <i>Zea mays</i>
16	-/+	ND	ETTIN-like auxin response factor	BAB85911.1/ <i>A. thaliana</i>
76	+	+	Proteína ribosomal 40S	AY105034/ <i>Z mays</i>
57	+	+	e-IF3 γ	CAE04596.2/ <i>O.sativa</i>
23	-	ND	Non-sense mediated mRNA decay UPF1	BAC832452.0/ <i>O.sativa</i>
90	-	-	Factor 2 de elongación	BAD26337/ <i>O. sativa</i>
78,70	+	ND	Putativo factor MYB1	CAE00856.1/ <i>O.sativa</i>
86	+	ND	Similar a factor de corte y poliadenilación 5.	CAE03439.1/ <i>O.sativa</i>
Metabolismo de carbohidratos y lípidos				
94,41	-	+	Piruvato quinasa	NP922817.1/ <i>O.sativa</i>
26,17,19,61,93,	+	-	Enzima málico dependiente de NADP, no fotosintético	AAQ88396.1/ <i>Z.mays</i>
22	-	ND	Oxysterol binding protein	NP200750.1/ <i>A.thaliana</i>
Metabolismo oxidativo				
10,12	+	+	Subunidad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial	NP568778/ <i>A. thaliana</i>
14	-	-	SOD dependiente de Mn	CAA310581/ <i>A.thaliana</i>
Otras funciones				
66	+	ND	Fertility restorer	BAD33652.1/ <i>O.sativa</i>
4	+	ND	Senescence associated protein	NP196707.1/ <i>A.thaliana</i>
3	+	+	Prefoldine like	BAD19943.1/ <i>O.sativa</i>
92	+	ND	Subunidad B de ATPasa vacuolar	AF375052/ <i>O.sativa</i>
44	+	ND	Cadena pesada de clatrina	AC073395.2/ <i>A.thaliana</i>
1	+/-	ND	Transportador de Zinc	AAU107451/ <i>O.sativa</i>
20	-	ND	Canal de iones mecanosensible	BAD281301/ <i>O.sativa</i>
62	-/+	-	Subunidad reguladora de PP2A	AY2244361/ <i>O.sativa</i>

6	+	ND	C3HC4 RING finger	NP56468.1/ <i>A.thaliana</i>
15	-	ND	Proteína transmembrana	BAD13014/ <i>O.sativa</i>
58	+	ND	Unknown protein	AY1101731/ <i>Z.mays</i>
59	+	ND	Unknown protein	AY105793/ <i>Z.mays</i>
63	+	ND	Unknown protein	EAY90863/ <i>O.sativa</i>
65	-	ND	Unknown protein	EAZ150559/ <i>O.sativa</i>

Tabla 3. Clones confirmados del rastreo de la librería y divididos en categorías funcionales. Se determina su interacción en medio con glucosa: +, positiva; +/- significativamente inferior y con ZmSnRK1a. ND: Interacción no determinado

La implicación de AMPK en la biogénesis de mitocondrias (Reznik and Shulman, 2006), el metabolismo oxidativo, y su relación con las especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (Zou et al., 2004), llevó a plantear un estudio más detallado de la interacción de ZmSnRK1b y el enzima aislado por doble híbrido SOD dependiente de manganeso. El estudio de la interacción entre estas dos proteínas *in vivo* es especialmente interesante ya que, según resultados publicados, no se ha descrito en plantas una relación directa entre el metabolismo oxidativo y el complejo SnRK. A continuación se describe en más detalle las características de esta MnSOD, así como las aproximaciones realizadas para estudiar su relación con ZmSnrK1b *in vivo*.

2.8 Interacción entre MnSOD y ZmSnRK1b

2.8.1 El clon 14 codifica para una Superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD 3-1)

La enzima superóxido dismutasa actúa como un mecanismo de defensa ante especies reactivas de oxígeno, generadas por diferentes tipos de estrés. Existen diferentes tipos de superóxido, en función del metal de su centro activo, que puede ser: Cu/Zn, Fe o Mn. De manera general se puede decir que cada forma se localiza en un compartimento celular determinado. Típicamente, se distribuyen según: las Cu/Zn-SOD en el citosol de células eucariotas, cloroplastos y en algunos procariotas; Mn-SOD, en mitocondrias y procariotas; FeSOD-Mn, en procariotas, algas y cloroplastos de algunas plantas superiores (Scandalios JG, 2005). A diferencia de muchos otros organismos, que tienen un único tipo de SOD en los diferentes compartimentos, las plantas poseen

múltiples formas de cada tipo codificadas por más de un gen, añadiendo de esta manera una mayor complejidad a las respuestas antioxidantes. En el caso del maíz, existen varias formas de Mn-SOD, reguladas transcripcionalmente de manera diferencial (Zhu and Scandalios, 1993). El clon 14 corresponde, aunque con diferencias en tres aminoácidos, a la proteína Mn-SOD 3.1. Este clon, codifica para la proteína completa, que tiene un peso molecular de 25.5 kDa, y un péptido de importe a mitocondrias de 31 aminoácidos (figura 45a). Aunque los programas de detección de Ser/Thr fosforilable no detectan estos aminoácidos como fosforilables, su secuencia contiene dos Ser con el consenso de fosforilación SnRK1, como se detalla en la figura 45b

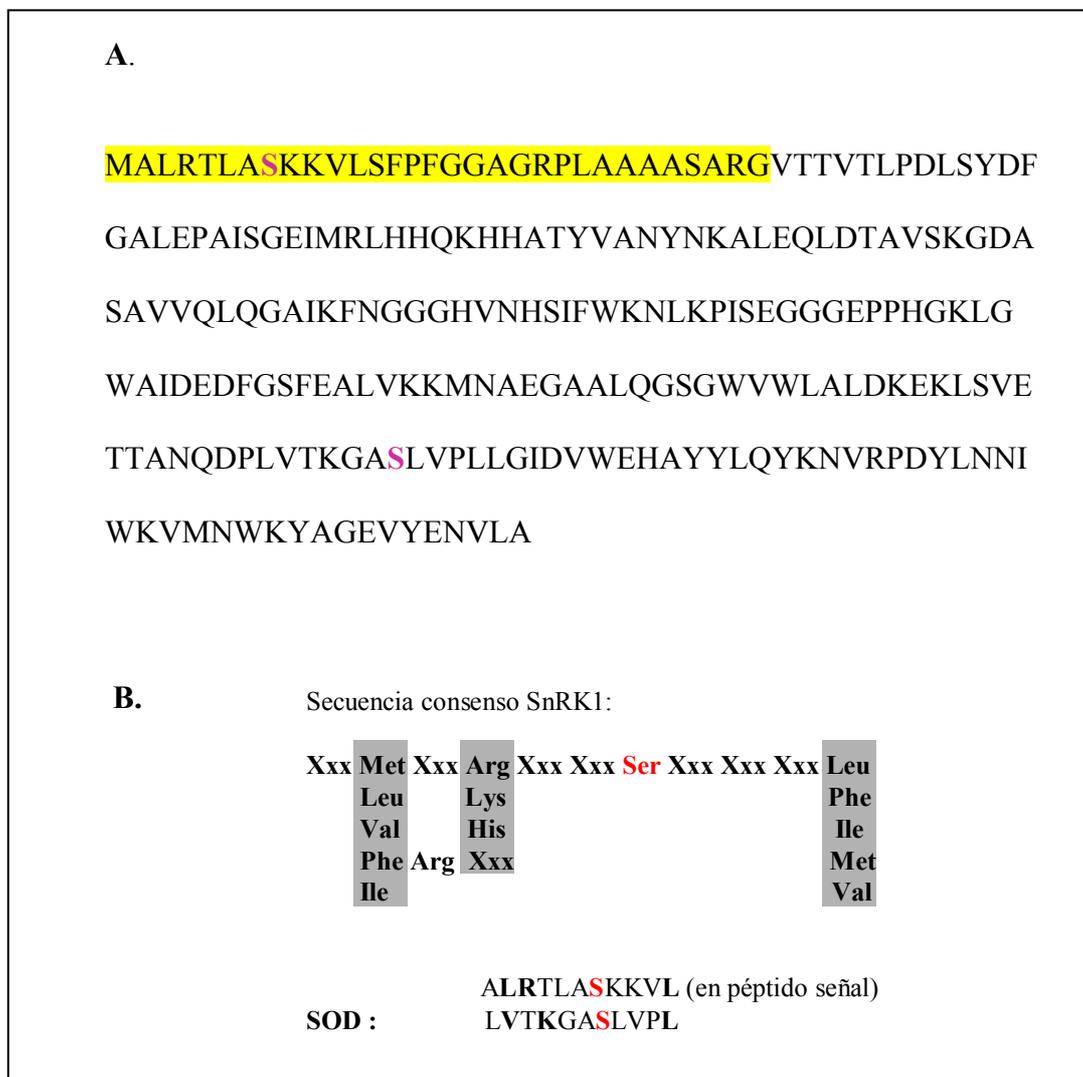


Figura 45. A. Secuencia aminoacídica del clon 14, codificante para una MnSOD. En amarillo se marca el péptido de importe a mitocondrias. Las putativas Ser fosforilables por SnRK1 se muestran en lila. B. Secuencia consenso de fosforilación SnRK1.

2.8.2 Estudio del dominio de interacción de ZmSnRK1b con MnSOD

Para determinar el dominio de interacción de ZmSnRk1b con el clon 14-2h, se realizaron ensayos de doble híbrido utilizando construcciones parciales de los dominios quinasa y regulador de ZmSNRk1b, fusionados al dominio de unión a DNA de GAL4 (BD). Para cada una de ellas, se testó su interacción con el clon 14-2h, obtenido de la librería (figura 46). Anteriormente se había observado que la interacción con el clon ZmSnRK1a era negativa (tabla 3). La divergencia a nivel de secuencia en el dominio regulador de las quinasa pertenecientes al grupo a y b, sugiere que este dominio puede ser el responsable de funciones específicas. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis se realizó una construcción quimérica entre el dominio quinasa de ZmSnRK1a y el dominio regulador de ZmSnRK1b, que se fusionó al dominio BD, para ver si de esta manera se reestablecía la interacción. Los resultados indican que el dominio de interacción entre Mn-SOD y ZmSnrK1b tiene lugar a través del dominio regulador, y además, que este dominio es suficiente para proporcionar especificidad de interacción a la quinasa con algunos *partners*, como es el caso de la proteína MnSOD3.1.

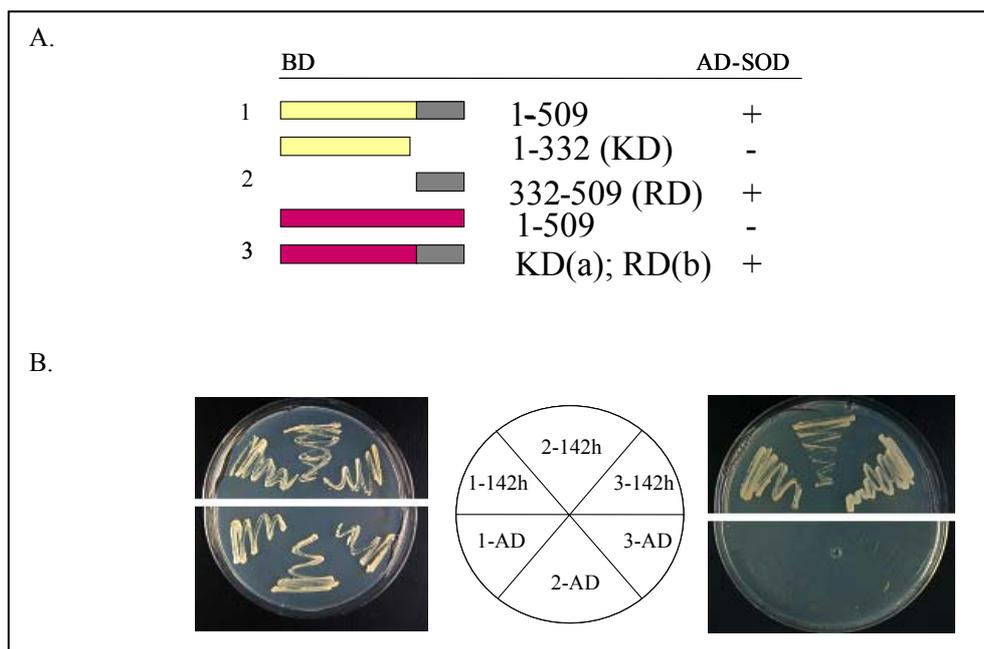


Figura 46. Estudio del dominio de interacción de ZmSnRK1b con el clon 14 mediante doble híbrido en levadura; **(A)** Construcciones utilizadas. La proteína ZmSnRK1b (1), así como el dominio quinasa (KD), el dominio regulador (RD, 2), ZmSnRk1a y la construcción quimérica ZmSnrk1KDa-RDb (3) se fusionaron al dominio de unión a DNA (BD). El clon 14 está fusionado al dominio de activación (AD). **(B)** Crecimiento de la levadura transformada con las construcciones 1-2-3 y el clon 14, así como con el vector vacío PGAD424. En la izquierda se muestra el crecimiento en medio selectivo para los dos plásmidos (-LT) y en la derecha en medio selectivo para las parejas interactoras (-LTHA).

2.8.3 Transformación transitoria en protoplastos de ZmSnRK1b y MnSOD: estudios *in vivo*

Como aproximación al estudio de la interacción entre ZmSnRK1b y MnSOD en un sistema vegetal, se decidió realizar transformación transitoria en protoplastos procedentes de una línea celular de *A.thaliana*. Se escogió esta material por su rapidez de crecimiento y facilidad de transformación, respecto a maíz. Los cDNAs codificantes para ZmSnRK1b y la superóxido, se fusionaron a los epítomos HA y c-myc, respectivamente, y con ellos se transformaron protoplastos de *A. thaliana* (figura 47).

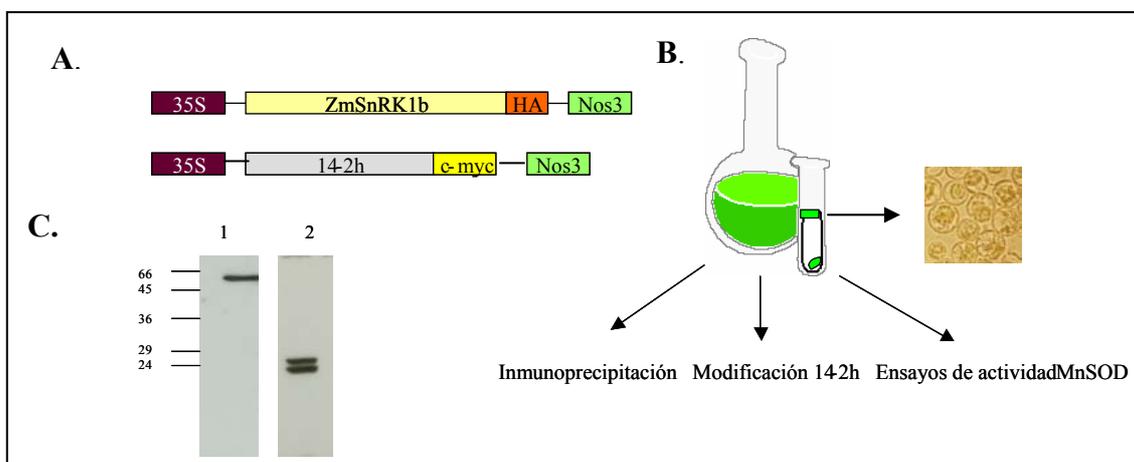


Figura 47. **A.** Construcciones utilizadas para la transformación de protoplastos de *A.thaliana*. **B.** Esquema de las estrategias seguidas para determinar la relación entre de ZmSnRK1b y MnSOD. **C.** Comprobación mediante análisis western de la correcta expresión de las proteínas de fusión ZmSnRK1b-HA(1) y MnSOD-c-myc(2) en los protoplastos transformados.

El primer paso después de la transformación de protoplastos fue la comprobación de que ambas proteínas se expresaban correctamente, a partir de extractos proteicos y análisis western (figura 47c). El nivel de expresión de ZmSnRK1b es mucho menor que el de MnSOD y su detección por western blot requiere una concentración de proteína más elevada, así como un tiempo de exposición mayor. Con el anticuerpo HA se detecta una banda que corresponde al tamaño esperado de la proteína de fusión ZmSnRK1b-HA. Con el anticuerpo c-myc observamos dos bandas entre 24 y 29 Kda, que podrían corresponder a la forma procesada y no procesada de la enzima superóxido. Con estos datos, asumiendo que la transformación de los dos plásmidos es equivalente, los controles de transformación se realizan con el anticuerpo c-myc, que detecta a MnSOD.

La primera aproximación que se planteó para el estudio de la interacción en este sistema, fue la inmunoprecipitación con anticuerpo HA unido covalentemente a una matriz Sepharosa. Estos experimentos fracasaron, probablemente por la baja expresión de ZmSNRK1b y su dificultad para inmunoprecipitar (tras una larga exposición observamos una banda muy floja del tamaño de ZmSnRK1b, resultados no mostrados). Otro de los aspectos a tener en cuenta es que debido a la localización mitocondrial de MnSOD, descrita por otros autores, la interacción con ZmSnRk1b en la célula vegetal tenga lugar únicamente antes del importe a mitocondrias, lo cual dificulta la determinación de esta interacción.

La caracterización de ZmSnRK1b como proteína quinasa llevó a plantearse la segunda aproximación, que consistió en analizar si existían cambios en las modificaciones postraduccionales de MnSOD cuando se cotransformaba con la quinasa (esperando que estos fueran principalmente del tipo fosforilación aunque sin descartar otros efectos indirectos). Para ello se realizaron electroforesis bidimensionales seguidas de western blot, de protoplastos transformados con ZmSnRK1b y MnSOD o únicamente con MnSOD. Al revelar con el anticuerpo c-myc, que reconoce la proteína MnSOD heteróloga, se observan tres isoformas para la banda de menor tamaño, y que asociamos con la forma procesada, y otras tres isoformas para la forma larga, aunque en ésta última, dos de las isoformas son mayoritarias (figura 48). Cuando se sobreexpresa la quinasa con MnSOD, se observa un desplazamiento de las tres isoformas (tanto en el caso de la forma procesada como de la no procesada) hacia el lado más ácido del gel. La fosforilación de proteínas, añade cargas negativas, y por tanto, la proteína se acidifica. Teniendo en cuenta la naturaleza de ZmSnRk1b es fácil especular que fosforilaría a MnSOD, tanto a la forma procesada como sin procesar, aunque no sabemos si antes o después de entrar a mitocondria. Además, estudios en patata y mamíferos han determinado que MnSOD se encuentra fosforilada (Bykova et al., 2003; Hopper et al., 2006).

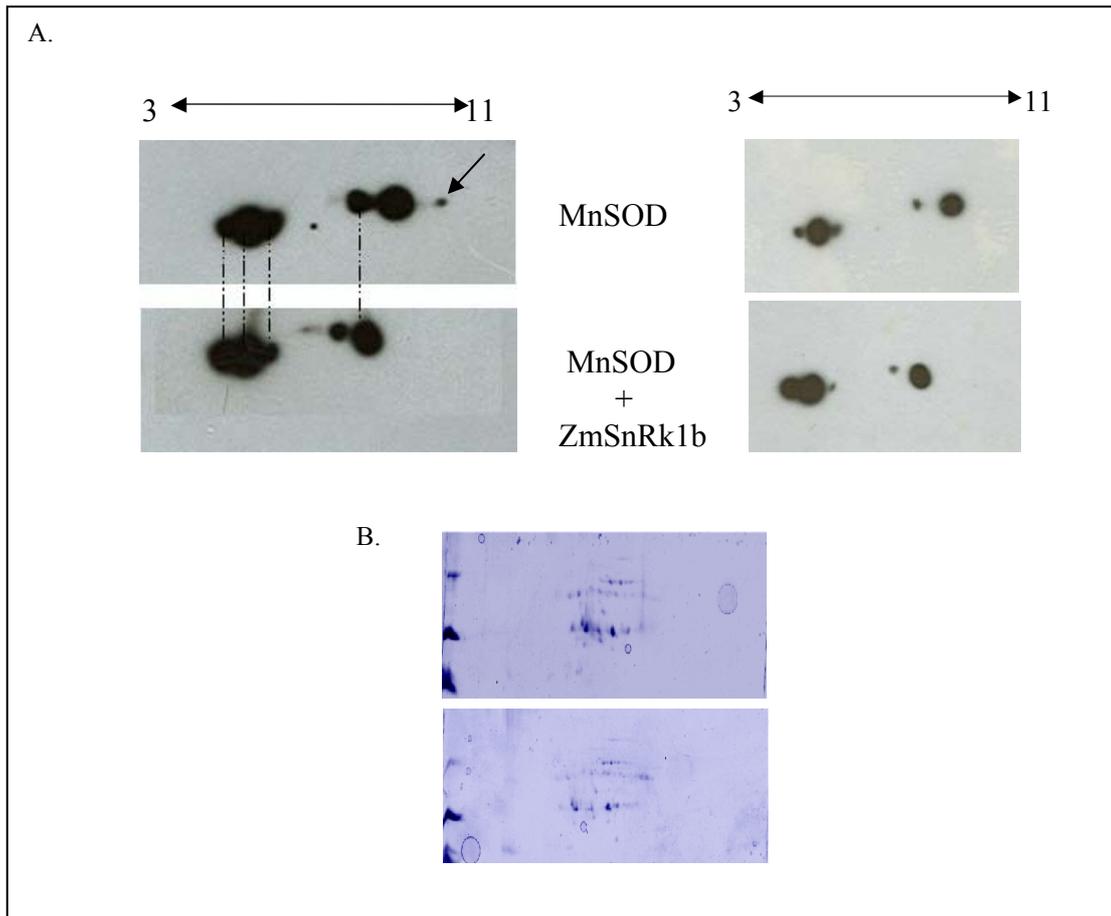


Figura 48. Análisis bidimensional y western blot con el anticuerpo c-myc, que reconoce a MnSOD, de extractos proteicos transformados únicamente con la superóxido, y coexpresado con ZmSnRK1b. **A.** Se muestran dos exposiciones a tiempos diferentes. La figura de la izquierda permite ver un claro desplazamiento hacia la zona básica de la forma larga, como marca la flecha. En la figura de la derecha se distinguen mejor las tres isoformas. **B** Comassie de ambos gels después de la transferencia.

2.8.4 Modulación de la actividad MnSOD

La tercera aproximación que se llevó a cabo fue el análisis de la modulación de la actividad MnSOD cuando se sobreexpresa con ZmSnRK1b. A partir de extractos proteicos transformados con MnSOD, o coexpresada con ZmSnRK1b, se realizaron ensayos de actividad SOD con el objetivo de determinar si la quinasa era capaz de modular su actividad. Como control, se transformaron protoplastos únicamente con ZmSnRK1b para poder determinar la banda correspondiente a la MnSOD heteróloga. Los extractos proteicos se separaron mediante geles nativos y se realizó el ensayo para SOD tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos (apartado 2.15). Los

protoplastos se incubaron en medio en presencia y ausencia de glucosa, para determinar si la situación de privación de glucosa podía, a su vez, regular la actividad de la superóxido dependiente de manganeso. Como se observa en la figura 49, no se detectan diferencias en cuanto a la actividad MnSOD heteróloga, en función de la presencia o ausencia de ZmSnRK1b.

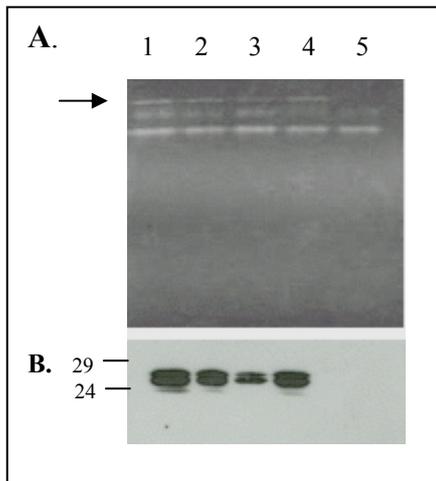


Figura 49. (A) Ensayo de actividad SOD de protoplastos transformados con ZmSnRK1b+MnSOD(1-2), únicamente con MnSOD(3-4) o sólo con ZmSnRK1b (5). Protoplastos incubados en medio con glucosa : 1,3,5; sin glucosa: 2,4. La flecha indica la banda correspondiente a la MnSOD heteróloga. (B). Análisis western de las mismos extractos que en A., revelados con el anticuerpo c-myc

2.8.5 Localización subcelular de la proteína 14-2h

Para comprobar que la superóxido dismutasa aislada se localiza en mitocondrias, ésta se clonó en fusión con la proteína GFP y se transformaron células de cebolla. Como se observa en la figura 50 el patrón de expresión punteado colocaliza con el colorante específico de mitocondria Mitotracker, confirmando su localización en estos orgánulos. En algunos casos se encuentran agregados de mayor tamaño, que no colocalizan con las mitocondrias teñidas, y que recuerdan de algún modo a los cuerpos de inclusión formados por ZmSnRK1b/a.

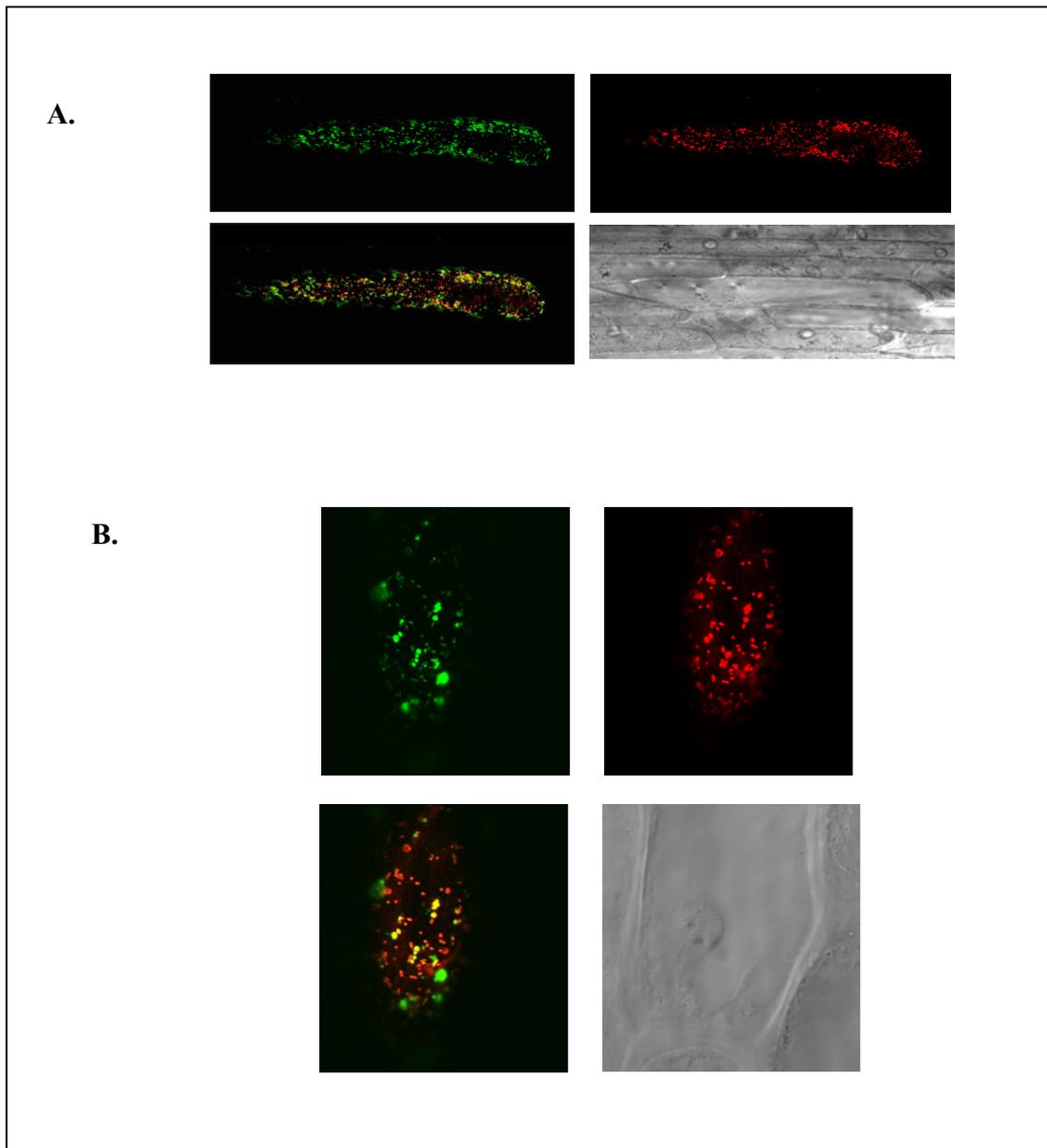


Figura 50. Imágenes de microscopía confocal de células transformadas con la construcción MnSOD-GFP. **A.** En la derecha, imagen superior, vista general de célula transformada. En la izquierda la misma célula teñida con el colorante Mitotracker. En la parte inferior se muestra la superposición de ambas imágenes y la imagen de transmisión. **B.** Detalle ampliado de célula transformada con MnSOD-GFP y teñida con Mitotracker (63X)

IV. DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

Capítulo I: Caracterización de la subunidad ZmAKIN $\beta\gamma$

Expresión y purificación del dominio KIS: formación de dímeros *in vitro*

El complejo SNF1/AMPK/SnRK1 juega un papel clave en la célula ante situaciones de estrés ambiental y nutricional. En el caso de plantas, estudios recientes han atribuido a este complejo un papel en el metabolismo del carbono similar al de sus homólogos en levadura y mamíferos, a pesar de haberse descrito diferencias en lo referente a su estructura y función. Mediante un rastreo por doble híbrido con la proteína Rab28 de maíz como cebo, se aisló en nuestro laboratorio un nuevo componente del complejo SnRK1 en plantas, ZmAKIN $\beta\gamma$ (Lumbreras et al, 2001). Este trabajo representó una nueva evidencia entre la conexión de la vía de señalización por glucosa con vías hormonales, en este caso, la del ácido abscísico.

La organización de dominios descrita en ZmAKIN $\beta\gamma$, hizo pensar en la existencia de complejos en plantas, con una composición diferente a lo que se había descrito hasta entonces, pudiendo ser el resultado de una adaptación específica que permita a las plantas nuevas funciones o mecanismos de respuesta. La capacidad de ZmAKIN $\beta\gamma$ de formar complejos SnRK1 diméricos con la subunidad catalítica, al menos *in vitro*, así como la conservación de la función de SNF4, sugerían una función dual que nos llevó al abordaje de la determinación de su estructura tridimensional.

Cómo ya se ha comentado en la introducción, mutaciones en el complejo AMPK son responsables de alteraciones metabólicas, siendo AMPK una importante diana terapéutica (Davies et al., 2006). El conocimiento de la estructura de ZmAKIN $\beta\gamma$, puede ser de gran ayuda para el diseño de nuevos fármacos que potencien la actividad de AMPK, y por ello se decidió realizar estudios cristalográficos para determinar su estructura. Como primera aproximación se decidió sobreexpresar el extremo N-terminal de la proteína que contiene el dominio KIS. El hecho de escoger este dominio se debió a cuestiones prácticas (solubilidad y facilidad para obtener cantidad de proteína suficiente), pero también a la importancia que consideramos que tiene a nivel biológico. Además de estar presente en las subunidades de tipo β , este dominio se ha encontrado en proteínas con actividad fosfatasa, (Fordham-Skelton et al, 2002). En la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$, este dominio juega un importante papel en la regulación de la interacción

con la subunidad catalítica, en condiciones en que la glucosa es limitante (Lumbreras et al., 2001). Aunque actualmente la función que se atribuye al dominio KIS no es, como se creía al inicio de este trabajo, la unión a la subunidad catalítica del complejo, la determinación de su estructura es igualmente muy importante, ya que es responsable de la unión a glucógeno del complejo AMPK (Hudson et al, 2003)

Sorprendentemente, durante la etapa de purificación del dominio KIS, se observó que este dominio tenía tendencia *in vitro* a formar dímeros. La separación por cromatografía de intercambio iónico resultaba en la separación de dos especies distintas, que cuando se analizaron por exclusión molecular correspondían, según su tamaño, a la forma dimérica y monomérica de la proteína. Además, la forma dimérica es más estable que la forma monomérica, como demuestra el hecho que una vez separada de la forma dimérica, parte de los monómeros se convierten en dímeros, que no se disocian posteriormente (ver figuras 16 y 17). Para determinar si esta asociación ocurre también con la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ entera, se llevaron a cabo experimentos de *pull-down*, entre ZmAKIN $\beta\gamma$ y su dominio KIS. La asociación del dominio KIS con ZmAKIN $\beta\gamma$ sugiere la formación de nuevas interacciones entre componentes del complejo. La verificación de esta asociación *in vivo* es fundamental para determinar si este tipo de interacciones puede ser un nuevo mecanismo de regulación, que permita la adquisición de nuevas funciones, o la interacción con nuevos componentes. Para demostrar esta interacción *in vivo*, la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ se ha fusionado a diferentes epítomos para realizar experimentos de coimmunoprecipitación en células vegetales.

La resolución de la estructura cristalina de SNF1 (Nayach et al., 2006) subunidad catalítica, y dos dominios CBS de la subunidad SNF4 (Rudolph et al., 2007) de levadura, han determinado que estas subunidades también forman dímeros. Si bien en ningún caso estas interacciones tienen lugar a través del dominio KIS, estos trabajos son un indicio de la emergente complejidad de relaciones entre las subunidades de este complejo. Así, cada vez existe un mayor número de evidencias de que componentes SnRK1 pueden formar complejos diferentes al clásico heterotrimérico. A pesar de que no se han descrito interacciones entre dominios KIS-KIS, la interacción por doble híbrido, en condiciones de glucosa limitante, de dos subunidades del tipo β en tomate, (Bradford et al., 2003) apoya la hipótesis propuesta en este trabajo de dímeros entre ZmAKIN $\beta\gamma$ y otras subunidades que contengan el dominio KIS.

Inducción de la expresión de ZmAKIN $\beta\gamma$ en plántulas sometidas a estrés osmótico

Estudios previos habían demostrado que ZmAKIN $\beta\gamma$, se expresaba en los primeros estadios de desarrollo de la semilla, así como en hojas y raíces de plántulas (Lumbreras et al, 2001). En este trabajo se ha demostrado que la expresión del transcrito ZmAKIN $\beta\gamma$ aumenta en situaciones de estrés osmótico, provocado por manitol, y de manera más significativa en raíz que en hoja. La obtención de anticuerpos contra el dominio KIS y la proteína entera ZmAKIN $\beta\gamma$, ha permitido corroborar y correlacionar, la expresión del mRNA con la expresión de proteína en las mismas condiciones de estrés. El análisis western blot muestra además, que la expresión de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ aumenta en presencia de ABA, inducción no observada previamente a nivel de mRNA.

La inducción de ZmAKIN $\beta\gamma$ ante situaciones de estrés osmótico sugiere que podría ser un componente que integra señales de vías de estrés osmótico y vías de señalización de glucosa, o estrés metabólico.

Interacción de ZmAKIN $\beta\gamma$ con SnRK1 y SnRK2

El incremento en la expresión de subunidades ZmAKIN $\beta\gamma$ en raíces sometidas a estrés osmótico, no está relacionado con un aumento de la actividad SnRK1, según los experimentos de inmunoprecipitación realizados. Estos resultados sugieren que ZmAKIN $\beta\gamma$ podría actuar de manera independiente a SnRK1, interaccionando con otras proteínas (con ella misma como se ha detectado *in vitro*) o con otras quinasas similares a SnRK1. Además, el patrón de expresión y su acumulación dependiente de estrés osmótico y ABA, sugieren una interacción con miembros de vías de estrés. Se decidió probar su interacción con otro miembro de la familia SnRK2, cercano a SnRK1, e implicado en la vía de transducción de ácido abscísico. La interacción en doble híbrido únicamente puede realizarse en condiciones de glucosa en el medio, ya que ZmSnRK2 presenta autoactivación en medio sin glucosa, y en estas condiciones se observa una interacción débil (no presentada en esta memoria). No obstante, ZmSnRK2 es capaz *in vitro* de modular positivamente la actividad de ZmSnRK2 lo cual apoya una interacción entre ambas proteínas. Queda por demostrar si esta modulación de la actividad

ZmSnRK2 por subunidades ZmAKIN β tiene lugar *in vivo*, y si esto sucede, cabe determinar cuales son las condiciones que llevan a ZmAKIN $\beta\gamma$ a interactuar con un tipo u otro de subunidad quinasa.

Capítulo II: Identificación y caracterización de diferentes subunidades del complejo SnRK1 de maíz

ZmSnRK1a y ZmSnRK1b, subunidades catalíticas

La perturbación de la actividad SnRK1 resulta en fenotipos de importante relevancia biotecnológica, y por ello, el estudio de estos componentes es de especial interés en especies de uso agronómico. La diversidad existente en composición y regulación de sus subunidades, es probablemente un mecanismo para otorgar mayor flexibilidad al complejo, permitiéndole de esta manera, realizar un mayor número de funciones.

En este estudio se han identificado, clonado y caracterizado diferentes miembros del complejo SnRK1 de maíz. La búsqueda en bases de datos ha permitido identificar y clonar, mediante RT-PCR, dos cDNAs que codifican para proteínas con homología a la familia de quinasas SnRK1. Estas proteínas se han denominado ZmSnRK1a y ZmSnrk1b por su clasificación, según su homología de secuencia con otras proteínas vegetales, dentro del subgrupo SnRK1a o SnrK1b. En cereales, la familia SnRK1 se divide a su vez en dos subgrupos. Miembros de la familia SnRK1a son más cercanos a sus homólogos de dicotiledóneas, y presentan un patrón de expresión constitutivo en todos los tejidos (Halford and Hardie, 1998). Dentro del subgrupo SnRK1b, se encuentran únicamente proteínas de cereales, y según la literatura, se expresan de forma preferencial en grano (Halford et al., 2003). Los cDNAs de ZmSnRK1a y ZmSnRK1b codifican para proteínas de 57.4 y 58.3 kDa, respectivamente. La homología de secuencia es elevada entre los diferentes miembros de esta familia, especialmente en el dominio quinasa. Así, ZmSnRK1a y ZmSnRK1b presentan una similitud del 93% en el dominio catalítico, y un 84% en el dominio regulador. Entre diferentes organismos, la homología es también más elevada en el dominio quinasa, aún cuando se comparan subunidades del mismo subgrupo. El elevado grado de conservación de las subunidades SnRK1 vegetales con organismos lejanos como *S. cerevisiae* (similitud con ZmSnRK1a

y ZmSnRk1b del 71% en el dominio quinasa y del 42% y 34% en el dominio regulador, respectivamente), indican la conservación de una función ancestral común. La unión de las subunidades catalíticas con los demás componentes del complejo, así como con otros componentes implicados en diferentes procesos, se ha descrito que tiene lugar a través del dominio regulador (Farras et al., 2001; Bhalerao et al., 1999; Lumbreras et al., 2001). La función de este dominio como interactador con otras proteínas, permite especular que la mayor divergencia en secuencia de este dominio, respecto al dominio quinasa, puede ser un mecanismo para otorgar a las diferentes isoformas especificidad en la unión con sustratos o interactores. Nuestros resultados de doble híbrido apoyan esta hipótesis, al demostrarse mediante una proteína de fusión quimérica, que es el dominio regulador de ZmSnRK1b, independientemente del dominio quinasa, el que permite la unión a la superóxido dismutasa, posible sustrato de ZmSnRK1b, (ver figura 46).

ZmSnRK1a y ZmSnRK1b presentan los dominios conservados de esta familia de proteínas. El putativo dominio quinasa, se encuentra en el extremo N-terminal y contiene en el subdominio VIII una Thr, conservada en todos los organismos, que puede ser fosforilada, como se ha demostrado en otros organismos (Sudgen et al, 1999a). Este residuo es indispensable para la función de SNF1 en levadura, ya que su mutación a alanina resulta en la pérdida total de función (Estruch et al., 1992). Adyacente al dominio quinasa, aminoácidos 286-328 en ZmSnRK1a y 289-330 en ZmSnRK1b, se encuentra el dominio UBA (Ubiquitine Associated Domain). Se trata de un motivo de aproximadamente unos 45 aminoácidos, que está implicado en la unión a ubiquitina, así como en la interacción con otras proteínas que no poseen este dominio (Mueller and Feigon, 2002). Este dominio está conservado en las subunidades de plantas, donde se ha descrito la asociación del complejo SnRK1 de *A. thaliana* con componentes del complejo proteasomal (Farras et al., 2001). En humanos, las subunidades catalíticas AMPK α no han conservado este dominio UBA, pero sin embargo, sí lo han conservado otra familia de proteínas quinasas cercana a AMPK (AMPK-related kinases). Curiosamente, este dominio actúa regulando la conformación de estas proteínas y favoreciendo así la fosforilación mediada por la quinasa activadora, LKB1, y su consecuente activación.

Zm β 1, una subunidad AKIN β con la estructura conservada de dominios: KIS y ASC

También mediante RT-PCR, se ha clonado un cDNA que codifica para una proteína con homología a las subunidades AKIN β y que se ha denominado Zm β 1 por su similitud con la proteína AtAKIN β 1 de *A.thaliana*. La secuencia aminoacídica deducida es de 201 aminoácidos, con un PM teórico de 32 kDa. A nivel de secuencia, las subunidades β son más divergentes en el extremo N-terminal (ver figura 30), y todas ellas contienen dos dominios característicos, y conservados en sus homólogos de mamíferos y levadura: el dominio KIS y el dominio ASC, ambos descritos originalmente por estar implicados en el ensamblaje del complejo SnRK1 (Jiang and Carlson, 1997). Además de estos dominios, recientemente se ha descrito que poseen un dominio N-isoamilasa (o GBD, de *Glycogen Binding Domain*), solapando al dominio KIS, que podría estar implicado en la unión a almidón, similarmente a lo que ocurre en mamíferos (Hudson et al., 2003), o en otra proteína vegetal que también contiene el dominio KIS/GBD (Kerck et al., 2006). Aunque no se conoce el significado biológico de la divergencia en el dominio N-terminal, estudios en levadura, sugieren que es el responsable de regular la localización subcelular, así como la interacción con sustratos. (Vincent and Carlson, 2001; Schmidt and McCartney, 2000; Hedbacker and Carlson, 2006). El alineamiento y el análisis filogenético de diferentes subunidades β de plantas (Figuras 30 y 31) muestra la diversidad de esta familia de proteínas, así como la existencia de un nuevo tipo de subunidades, AKIN β 3, que carecen de gran parte del dominio KIS (Gissot et al., 2004) y que ha sido descrita en varias especies vegetales (Buitink et al., 2003). Los autores que han descrito AKIN β 3, han revisado a su vez las diferentes subunidades existentes en especies vegetales y las han clasificado en dos subgrupos. En el caso de maíz, indican la existencia de una subunidad β 1, y discuten la existencia de una subunidad del tipo β 3. No se han encontrado subunidades del tipo AtAKIN β 2, que formaría un grupo aparte donde únicamente aparecen subunidades de especies de dicotiledóneas.

Zmy1 y Zmy2, subunidades SNF4 divergentes

La gran diversidad en plantas, por lo que se refiere a componentes de este complejo, no excluye a las subunidades γ . Estas subunidades se han dividido en tres grupos, siendo el grupo en el que se encuentran las subunidades $\beta\gamma$, el más cercano a sus homólogos de levaduras y mamíferos. Para la identificación de este tipo de subunidades en maíz, se realizó BLASTx con secuencias de otras especies pertenecientes a los tres grupos. De esta manera, se identificaron 2 ESTs que permitieron el clonaje de dos cDNAs codificantes para dos subunidades del tipo γ , que denominamos Zmy1 y Zmy2. Aunque con grandes diferencias a nivel de secuencia, las proteínas pertenecientes a esta familia presentan cuatro dominios CBS en tándem. Estos dominios, presentes también en las dos subunidades AKIN γ aisladas de maíz, se han descrito en otros grupos de proteínas (Bateman, 1997) y se ha postulado que ejercen un papel regulador, siendo en el caso de AMPK, el responsable de la unión AMP/ATP (Scott et al., 2004). Recientemente, se ha descrito que el segundo dominio CBS de AMPK γ tiene una región pseudosustrato capaz de inhibir la subunidad catalítica (Scott et al., 2007). El análisis filogenético (ver figura 33) sitúa a Zmy1 y Zmy2 en un grupo junto a subunidades más divergentes y en el que se encuentra la subunidad AtAKIN γ de *A. thaliana*, que se ha demostrado ser incapaz de complementar al mutante *snf4* de levadura. La comparación de secuencia entre subunidades γ de plantas refleja diferencias significativas entre los diferentes grupos. Así, Zmy1 y Zmy2 mantienen, respectivamente, una similitud del: 76 y 59% con AtAKIN γ , 45 y 42 % con AtSNF4b y 43% con SNF4 de levaduras. Si esta divergencia en secuencia va acompañada de un distanciamiento en función está todavía por determinar, aunque la presencia de los dominios CBS, sugiere la conservación, al menos en parte, de una función común.

Las subunidades catalíticas ZmSnRK1a y ZmSnrK1b son homólogos funcionales de SNF1

El grado de conservación de las secuencias de ZmSnRK1a y ZmSnrK1b, respecto a organismos lejanos como la levadura, no se extiende únicamente a su secuencia sino también a su función, como indica la capacidad de estos clones, para

complementar a un mutante *snf1* de levadura. La delección del gen SNF1 impide el crecimiento en fuentes de carbono alternativas a la glucosa, como sacarosa, glicerol o etanol. La existencia de mutantes SNF1 y SNF4, que presentan un fenotipo similar, ha permitido la identificación de proteínas homólogas en otros organismos, así como la identificación de diferentes proteínas supresoras no relacionadas directamente con el complejo (Kleinow et al., 2000). Cuando ZmSnrK1b o ZmSnRK1a se sobreexpresan en mutantes *snf1* o *snf4* estos recuperan la capacidad para crecer en fuentes de carbono alternativas como galactosa o glicerol (ver figura 37). La capacidad de la subunidad catalítica, en condiciones de sobreexpresión, para reestablecer el fenotipo *snf4*, se ha descrito en otras especies vegetales, así como también en levadura, indicando una actividad independiente de SNF4. Asimismo, se han identificado mutaciones en SNF1 capaces de suprimir el requerimiento de SNF4, siendo una de éstas, el cambio de la glicina (G) 53 a una arginina R (Estruch et al., 1992). La mutación SNF1G53R resulta en una mayor actividad quinasa de los complejos inmunoprecipitados, y ha llevado a plantear que este dominio N-terminal podría ser el responsable de la interacción con otro tipo de subunidades reguladoras, ya que no parece afectar la regulación con SNF4. Curiosamente, algunas de las subunidades catalíticas de plantas, como SnRK1b mantienen esta mutación, mientras que otras, como ZmSnRK1a conservan la glicina. En el caso de arroz, las subunidades OSK4 y OSK5, pertenecientes al grupo SnRK1b, presentan una lisina (K) en esta posición, mientras que OSK1, incluida en el grupo SnRK1a, conserva la G (ver figura 28). No podemos decir que el cambio sea característico de las subunidades de cereales, ya que subunidades como NPK5 de tabaco, presentan una arginina en esta posición. No se conoce el efecto que estas diferencias pueden provocar en la planta. Son necesarios estudios *in vivo* para determinar si estos cambios pueden ser responsables de la formación de complejos con diferente actividad o afinidad de sustrato y así, en el caso de cereales, o de aquellos organismos que puedan contener ambas isoformas, permita a la planta una mayor regulación de funciones.

Ninguna de las dos subunidades γ aisladas de maíz es capaz de complementar al mutante *snf4* de levadura. En este caso, se puede decir que la divergencia de secuencia va probablemente acompañada de una divergencia funcional, que podría proporcionar a las plantas nuevos mecanismos de regulación no existentes en mamíferos o levadura, organismos donde no existe tal heterogeneidad de subunidades γ . A pesar de tener una

estructura totalmente diferente, las subunidades del tipo $\beta\gamma$, sí son capaces de complementar al mutante SNF4 (Lumbreras et al., 2001), al igual que otra subunidad del grupo que incluye a LeSNF4, (Bradford et al., 2004), más alejado filogenéticamente de SNF4, que $\beta\gamma$ (ver figura 33).

Regulación de la expresión de subunidades ZmSnRK

La expresión de los genes ZmSnRK1a/b es especialmente elevada en los primeros estadios de desarrollo de la semilla, sufre un declive durante la maduración y vuelve a aumentar durante la germinación. Este patrón corresponde con tejidos metabólicamente activos. En arroz, donde el estudio de la expresión de estos genes se ha desarrollado de manera más exhaustiva, se ha demostrado que su expresión está correlacionada con la aparición de gránulos de almidón en los diferentes tejidos y la transición de tejidos fuente a sumidero (Kaneage et al., 2005). En hojas, ninguna de las subunidades catalíticas ZmSnRK1 responde a diferentes condiciones de luz, o elevadas concentraciones de azúcares, por lo que la regulación transcripcional de estas subunidades quinasa, no parece ser un mecanismo de modulación de la actividad, al menos en estas condiciones. Sin embargo, algunos sustratos de SnRK1 como la nitrato reductasa, la sacarosa fosfato sintasa y la HMG-CoA- Reductasa, están relacionados con la actividad fotosintética así como con señales ambientales (luz) y metabólicas (Huber and Huber, 1990; Mackintosh, 1992). Por otra parte, en *Physcomitrella patens*, se ha demostrado la necesidad de actividad SnRK1 para crecer en condiciones de luz/oscuridad (Thelander et al., 2004). Estos datos indican la necesidad de una modulación en función de las condiciones ambientales. Tal modulación podría realizarse a través de la regulación de la expresión de las subunidades β y/o γ . Así, el incremento del transcrito de Zm β 1 observado en este trabajo, en condiciones de oscuridad, sugiere que esta subunidad podría modular la actividad SnRK1 según la situación de luz/oscuridad que la planta percibe. Datos similares ya se habían descrito para la subunidad β 1 de *A. thaliana* que curiosamente presenta una expresión antagonista a la de AKIN β 2 (Bouly et al., 1999). De manera similar, también en *Medicago truncatula*, las subunidades β 1 se regulan según las condiciones de luz, igual que ocurre con AKIN γ , (Buitink et al., 2003). Según estas premisas, debe existir un control de la actividad de SnRK1 ante situaciones como cambios de luz, en qué la célula

debe enfrentarse a una disminución de los azúcares disponibles, y esto podría realizarse a través del control de la expresión de las diferentes subunidades. Los mismos autores han descrito además, que la regulación transcripcional de subunidades con un patrón de expresión idéntico, no está mediado por los mismos factores. Todo ello les lleva a sugerir que la regulación diferencial de subunidades participantes en el mismo complejo, puede resultar en un mecanismo para integrar diferentes vías reguladoras.

Interacción entre las subunidades SnRK identificadas

La existencia de diferentes isoformas permite, teóricamente, la formación de un mayor número de complejos. Como aproximación al estudio de complejos SnRK1 en maíz, se han realizado ensayos de doble híbrido en levadura con las subunidades identificadas. Los resultados obtenidos en este tipo de experimentos no apoyan la formación de un complejo heterotrimérico con las subunidades testadas. No se detecta interacción entre las subunidades catalíticas con Zm γ 1 o Zm γ 2, y tampoco entre éstas y la subunidad Zm β 1. Por el contrario, se da interacción de Zm γ 1 y ambas subunidades catalíticas con la subunidad AKIN β 2 de *A.thaliana*, aunque no sabemos si esto puede tener un significado biológico, ya que en monocotiledóneas no existen evidencias de que este tipo de subunidades β pueda existir. Tampoco se ha detectado una interacción entre la subunidad ZmAKIN $\beta\gamma$ y las subunidades catalíticas ZmSnRK1a o ZmSNrK1b. Sin embargo, cuando se utiliza únicamente el dominio regulador de ZmSnRk1b, éste si es capaz de interactuar con la subunidad ZmAKIN $\beta\gamma$, y además se incrementa la fuerza de interacción con la subunidad β 1. Esto sugiere, que en levadura, por alguna razón desconocida, no se da la conformación necesaria para que el dominio regulador interactúe con otros componentes del complejo como AKIN $\beta\gamma$. Para solventar este posible problema, se han iniciado estudios en un sistema más cercano, como es *A. thaliana*, en el que mediante transformación transitoria de protoplastos, e inmuno-precipitaciones de las subunidades fusionadas a diferentes epítomos, se pretenden estudiar las interacciones entre subunidades.

Otra hipótesis, por la que es posible que no detectemos interacción entre subunidades catalíticas y subunidades $\gamma/\beta\gamma$, podría ser la necesidad de subunidades mediadoras, como β , y especialmente β 3, cuya interacción con subunidades catalíticas

y subunidades $\beta\gamma$ se ha descrito (Gissot et al, 2006), para la formación de un complejo. Según esta hipótesis la homología entre las subunidades de maíz y las de levadura podría no ser suficiente para que estas últimas puedan actuar de mediadoras entre las subunidades, por ejemplo, ZmSnRK1 y $\beta\gamma$.

Por otra parte, es muy probable que otro tipo de subunidades no identificadas sean las responsables de interaccionar con ZmSnRK1b/a. Gissot et al. (2004), han descrito un tipo de subunidades $\beta 1$ que no corresponde a la que se ha detectado en este trabajo, pero sin embargo, es más homóloga a AtAKIN $\beta 1$ que AtAKIN $\beta 2$, y presenta con la que aquí se ha denominado Zm $\beta 1$, un 81 % de similitud. Estos mismos autores mencionan la posible existencia de subunidades AKIN $\beta 3$ en maíz.

Tampoco se puede descartar la posibilidad de que estas subunidades puedan funcionar independientemente de las subunidades β/γ . Cabe destacar, que según resultados publicados, no se han descrito hasta el momento, interacciones entre las subunidades SnRK1b y otros componentes del complejo SnRK1.

Expresión de la subunidades catalíticas en E.coli y ensayos de actividad

Para determinar la actividad SnRK1 de los clones aislados, ZmSNRK1a y ZmSnRK1b, estas proteínas se sobreexpresaron en *E.coli*. Sin embargo, la acumulación de ambas proteínas en cuerpos de inclusión al sobreexpresarse en bacteria, llevó a realizar una construcción parcial que incluía el dominio quinasa más el dominio adyacente UBA de ZmSnRK1b. En el momento de realizar esta construcción no existían estudios sobre el dominio regulador en plantas y se decidió utilizar la secuencia que alinea con el dominio quinasa de SNF1, descrito como responsable de la interacción con el dominio regulador (Jiang and Carlson, 1996). El dominio quinasa purificado de ZmSnRK1b es capaz de fosforilar *in vitro* al péptido SAMS, demostrándose así la capacidad de reconocer la misma secuencia consenso de fosforilación que AMPK/SNF1. Es interesante remarcar que este dominio sobreexpresado en *E.coli* presenta actividad *in vitro*, sin necesidad de una proteína quinasa activadora como sucede en mamíferos o levaduras. Este hecho, que ya se había observado con proteínas de arabidopsis, arroz o tabaco (Bhalerao et al, 1999; Takano et al., 1998; Muranaka et al, 1994) no significa que *in vivo* SnRK1 no sea fosforilada y activada por otra quinasa. De hecho, estudios en espinaca han descrito la activación de SnRK1, previa inactivación

con fosfatasa, con la proteína quinasa activadora de AMPK (AMPKK) (Sudgen et al., 1999). Recientemente se han clonado dos proteínas quinasas de arábidopsis que funcionan como activadoras de SNF1 en levadura (Hey et al., 2007), por lo que en plantas es de esperar que realicen una función similar fosforilando y activando así a SnRK1. Los resultados obtenidos muestran una preferencia de ZmSnRK1b por iones manganeso, como cofactor, respecto a iones Mg^{2+} , igual que sucede con la subunidad NPK5 de tabaco. La publicación del dominio autoinhibidor de AMPK (Pang et al., 2007), y su solapamiento con el dominio UBA llevó a plantear si la baja actividad obtenida podía deberse a que se había incluido gran parte del que podría ser el dominio autoinhibidor, según el alineamiento con AMPK. Para resolver esta cuestión se clonó, sobreexpresó y purificó el dominio quinasa, esta vez, sin el motivo UBA. Los ensayos de actividad con esta construcción no resultaron en un aumento en la actividad SAMS. En humanos, otras proteínas relacionadas con AMPK, conservan el dominio UBA adyacente al dominio quinasa, a diferencia de AMPK. Se ha propuesto que la función de este dominio es regular la conformación de estas quinasas de manera que son más accesibles a la quinasa activadora LKB1, favoreciendo así su fosforilación y consecuente activación (Jaleel et al., 2006). No sabemos si en plantas este dominio puede ejercer una función similar a la de las proteínas MARK, pero nuestros resultados indican que, al menos para el caso de ZmSnRk1b, este dominio no actuaría como dominio autoinhibidor como sucede en el caso de AMPK.

Localización subcelular de ZmSnRK1a y ZmSnRK1b

La localización subcelular de la proteína de fusión ZmSnRk1b en núcleo sugiere una función como reguladora en la expresión génica. Debido a su tamaño (88kDa) es improbable que pase a través del poro nuclear por difusión pasiva y a pesar de no tener una señal de localización nuclear típica, requiere un transporte activo. Esta función podrían llevarla a cabo proteínas reguladoras, de tipo γ o β . En levaduras, se ha descrito que es la subunidad GAL83 (subunidad del tipo β) la que media la localización subcelular de SNF1. Cada subunidad Sip se encuentra en un compartimento celular, pudiendo dirigir a la subunidad quinasa hacia diferentes sustratos en función de, por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes (Vincent et al., 2001). Resulta interesante la localización en nucleolos, compartimentos subnucleares muy dinámicos donde tiene

lugar la biogénesis de ribosomas, y a los que se ha implicado en otras funciones como la maduración de diferentes especies de RNA no ribosomales (Scheer and Hock, 1999).

La naturaleza del patrón punteado, que aparece a partir de 24 horas en el caso de ZmSnRk1b, o más temprano en el caso de ZmSnRk1a, no se ha descifrado por el momento. Por analogía con las funciones de AMPK en mamíferos, así como resultados de doble híbrido de este trabajo, inicialmente se pensó que este patrón podría corresponder a mitocondrias. Aunque no se ha conseguido obtener un doble marcaje para mitocondrias y ZmSnRk1b, en el caso de ZmSnRk1a se ha podido demostrar que estos *speckles* no corresponden con mitocondrias. La subunidad AMPK α 2 y AMPK β 1 de mamíferos presentan un patrón punteado en citoplasma, en experimentos de inmunocitoquímica, pero éstos tampoco se han correlacionado con ningún orgánulo celular (Salt et al., 1998; Warden et al., 2003). Más recientemente se ha demostrado la asociación de subunidades AMPK con cuerpos de inclusión que contienen glucógeno (Hudson et al., 2003). Hardie et al. (2003) sugieren que la localización de AMPK a gránulos de glucógeno, a través de la unión del GBD de las subunidades β , puede ser un mecanismo de percepción de los niveles de glucógeno en la célula. Dada la conservación del dominio GBD en las subunidades β de plantas, es posible que las subunidades SnRK1 se encuentren en plastidios de almacenamiento de compuestos de reserva como almidón, dirigidas a estos orgánulos a través de subunidades β . Por otra parte hay que tener en cuenta que la sobreexpresión puede producir artefactos como la acumulación en cuerpos de inclusión. En el futuro, para determinar la localización subcelular de ZmSnRk1a/b, paralelamente a estudios de colocalización con otros marcadores, es necesario un sistema independiente a la sobreexpresión transitoria, como estudios de inmunolocalización con anticuerpos específicos.

Identificación de proteínas que interaccionan con SnRK1b

Búsqueda de componentes SnRK1

El objetivo inicial de realizar un rastreo de doble híbrido con la proteína ZmSnRk1b era la identificación de proteínas reguladoras del tipo β/γ , de las cuales no se disponía de ninguna información sobre su interacción con este grupo de quinasas, específicas de cereales. Los experimentos de doble híbrido se han realizado en medio

selectivo sin glucosa, con fuentes de carbono alternativas como galactosa, etanol y glicerol, para detectar interacciones en situaciones en que la quinasa está activa. Contrariamente a lo esperado, no se ha identificado ningún tipo de subunidades con homología a las del clásico complejo heterotrimérico pero sí, un gran número de proteínas implicadas en procesos celulares muy diversos como se refleja en la tabla 3.

Aunque no es considerado un componente del clásico complejo heterotrimérico, la proteína fosfatasa 2A se ha encontrado asociada a la subunidad catalítica SNF1 de levadura, y es responsable en parte, de la interacción entre SNF1 y SNF4 (Gimeno-Alcaniz and Sanz, 2003). La asociación con subunidades SnRK1 es indirecta, ya que PP2A provoca su defosforilación así como la de algunos de sus sustratos (Douglas et al, 1997; MacKintosh, 1992). La identificación del clon 62 como proteína homóloga a una subunidad reguladora de PP2A, sugiere la conservación de la asociación PP2A-SnRK1 en plantas. Si bien la interacción de este mismo clon con la subunidad ZmSnRK1a es negativa, esto no excluye la posibilidad que PP2A interactúe con este otro tipo de subunidades ya que existen diferentes subunidades reguladoras, que son además las que determinan la especificidad de sustrato y la localización subcelular del holoenzima (Farkas et al, 2007).

Metabolismo del DNA/RNA

La identificación en este estudio de diferentes clones con homología a factores de transcripción o dominios de unión a RNA refleja un probable papel de SnRK1 en la regulación de la expresión génica. En el caso de levaduras, se conoce que la expresión de 430 genes son dependientes de SNF1 (Young et al., 2003). Entre los mecanismos que permiten tan amplia regulación se han descrito la modificación de la histona III (Lo et al., 2005), la interacción con la RNA polimerasa II (Kuchin et al., 2000) y la fosforilación de algunos factores de transcripción como Mig1 (Smith et al., 1999). La información disponible en plantas sobre la función de SnRK1 en la regulación de la expresión génica es mucho menor, pero existen algunas evidencias de que puede jugar un papel similar al de levaduras o mamíferos. Así, la expresión de genes involucrados en el metabolismo de carbono como α -amilasa, o sacarosa sintasa, requiere de la expresión de SnRK1 (Laurie et al., 2003; Purcell et al., 1998). Un estudio a mayor escala, en embriones de guisante, muestra la desregulación de la expresión de genes asociados a procesos de desarrollo y señalización, regulación de la cromatina, síntesis

de la pared celular, actividad biosintética de plastidios y proteólisis regulada (Radchuk et al., 2005). Sin embargo, hasta el momento no se han descrito los procesos por los cuales SnRK1 puede provocar la desregulación de tal amplio número de genes en plantas. Uno de los mecanismos por los que diferentes factores de transcripción son capaces de modular la expresión génica es a través de su interacción con el DNA/RNA que puede regularse en función de la localización celular o su diferente afinidad para unir ácidos nucleicos.

Entre los factores identificados por doble híbrido, se encuentran clones parciales con homología a factores de transcripción o proteínas de unión a RNA con dominios como RRM (RNA- Recognition Motif) o KH (clones 8 y 9), o con homología a factores de transcripción como el clon 16 que presenta una elevada homología con el factor ETTIN, de *A.thaliana*, implicado en la respuesta a auxinas. El clon 7 presenta homología a un factor con un dominio GATA dedo de Zinc y un dominio CCT.

La interacción de ZmSnRK1b con el clon 23, que presenta homología con el factor UPF1, conservado en mamíferos y levaduras, resulta especialmente interesante. Esta proteína, altamente fosforilada en humanos (Ohnishi et al, 2003), forma parte de una maquinaria de control del procesamiento del mRNA, *non sense mediated mRNA decay*, encargada de eliminar aquellos mRNAs aberrantes, con codones de STOP prematuros, o con formas de *splicing* incorrectas. Un mutante *missense* del homólogo de esta proteína en *Arabidopsis*, presenta un fenotipo de hipersensibilidad a glucosa y ABA, así como una reducción en la expresión inducida por azúcar de los genes β -amilasa y Din11, entre otros (Yoine et al., 2006). Resultados del estudio de este mutante apuntan hacia un papel del homólogo de UPF1 de *arabidopsis*, en la regulación postranscripcional de una parte de la vía de señalización por azúcares.

Dentro de este grupo también resulta interesante la interacción de ZmSnRK1b con tres factores implicados en el inicio de la traducción (clones 76, 90 y 57, que codifican respectivamente, para una proteína de la subunidad ribosomal 40S, el factor de elongación eEF2, y un componente del complejo de inicio de la traducción, eIF3h). La implicación de AMPK en la inhibición de la síntesis proteica ha sido descrita en humanos, concretamente a través de la fosforilación y consecuente inactivación de eEF2, aunque no de manera directa sino mediante la fosforilación de otra proteína quinasa encargada de fosforilar a este factor (Browne et al., 2006). Recientemente, se ha descrito que el etanol incrementa la fosforilación de eEF2, de manera dependiente de la actividad de AMPK y PP2A, por un mecanismo que no requiere la actividad de la

quinasa de eEF2 (Hong-Brown et al., 2007). La síntesis de proteínas es un proceso energéticamente muy costoso, por lo que es necesario un mecanismo de control riguroso que responda a las condiciones metabólicas de la célula. Este control, según estudios principalmente realizados en mamíferos, existe en las tres etapas de este proceso: iniciación, elongación y terminación. En la primera etapa de iniciación, el complejo eIF3, formado por 13 subunidades diferentes, permite la asociación del mRNA con la subunidad 40S así como con otros factores de iniciación de la traducción. En humanos, la identificación de la fosforilación de diferentes subunidades de este complejo, incluido eIF3p40, el gen homólogo al clon identificado, sugiere que podría ser un mecanismo de regulación del ensamblaje (Damoc et al., 2007). La composición de este complejo es similar en plantas, mamíferos y levaduras (Asano et al., 1997) y es por ello probable que existan también mecanismos similares de regulación.

La interacción de ZmSnRk1b con los clones 90-2h, 76-2h y 57-2h, sugiere que en plantas SnRK1b podría ejercer una función similar a la de AMPK en la inhibición de la síntesis proteica, a través de la interacción con eEF2, eIF3 y 40S, por un mecanismo todavía desconocido. La identificación de estos clones como interactores de ZmSnRK1b, sugiere la participación de esta quinasa y así su posible participación en estos complejos de traducción, nos ha llevado a replantear la naturaleza de los *speckles* observados en cebolla, ya que componentes de esta maquinaria se ensamblan en unas estructuras similares en células de mamíferos, denominadas *Processing Bodies* y *Stress Granules* (Kedersha et al., 2005).

Metabolismo de carbohidratos

Quizás menos sorprendente es la interacción de ZmSnRK1b con proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos como la piruvato quinasa, enzima regulador del último paso de la glucólisis, o el enzima málico, responsable de la decarboxilación de malato para pasar a piruvato. La modificación postraduccional de la enzima piruvato quinasa citosólica, ha sido descrita en soja, y evidencias bioquímicas sugieren que las quinasas responsables podrían ser CDPK y SnRK1 (Tang et al, 2003). El enzima málico se presentaba como posible candidato para la interacción con SnRK1, por el elevado número de veces que había aparecido, así como por su relación con el metabolismo de carbohidratos, sin embargo todos los clones aislados representaban la misma forma parcial del enzima, el extremo C-terminal. Para recomprobar la

interacción se decidió clonar el cDNA codificante desde el ATG a TGA, y una vez obtenido se testó su interacción con la subunidad ZmSNRk1b. El resultado negativo descartó estudios posteriores con este enzima.

Metabolismo oxidativo: MnSOD y ZmSNRK1b

Además de haberse identificado clones codificantes para proteínas de localización plastídica como el enzima málico dependiente de NADP y la piruvato quinasa, hemos identificado dos clones con homología a proteínas mitocondriales: el clon12 codificante para una subunidad del complejo I mitocondrial y una superóxido manganeso, clon 14. Homólogos a la subunidad del complejo I y la superóxido dismutasa, se han encontrado fosforilados en mamíferos y plantas (Chen et al., 2004; Hopper et al., 2006; Bykova et al., 2003). Aunque no se ha demostrado la localización subcelular de AMPK en mitocondrias, su influencia sobre éstas ha sido confirmada por diversos estudios en humanos (Reznick and Shulman, 2006). Por otra parte, la relación entre AMPK y especies reactivas de oxígeno (ROS) también ha sido descrita en mamíferos. Situaciones que provocan un aumento de ROS a través de la inhibición de la cadena respiratoria activan a AMPK (Zou et al., 2004), y ésta a su vez activa la biogénesis de mitocondrias así como la expresión del mRNA de MnSOD (Kukidome et al., 2006). Todas estas evidencias animaron a un estudio más exhaustivo de la interacción entre ZmSnRK1b y el clon 14, que presentaba, como ya se ha comentado, homología con una superóxido dismutasa de maíz dependiente de manganeso y con un péptido de señalización mitocondrial. Estos enzimas son un mecanismo de defensa ante ROS, generados por diferentes tipos de estrés bióticos y abióticos. Las plantas tienen más de una forma de enzima superóxido dismutasa (SOD) de cada tipo, codificadas por más de un gen, indicativo de respuestas antioxidantes más complejas (Scandalios, 2005). En el caso de maíz se han descrito tres superóxido dismutasas dependientes de manganeso, todas ellas de predicción subcelular mitocondrial (Zhu and Scandalios, 1993).

En ensayos de doble híbrido en levadura la interacción de la superóxido dismutasa con las subunidades SnRK1 es específica, ya que, únicamente se produce interacción con la subunidad específica de cereales, ZmSnRK1b, y no con ZmSnRK1a. La interacción se produce a través del dominio regulador de ZmSnRK1b, siendo responsable de la especificidad de sustrato, ya que cuando se fusiona al dominio quinasa

de ZmSnRK1a, la proteína quimérica es capaz de interactuar con la superóxido (ver figura 46). Además, la interacción es más fuerte en ausencia de glucosa, sugiriendo que ésta se produce cuando la quinasa se activa. Hasta el momento, la interacción de ZmSnRk1b y MnSOD no ha podido demostrarse *in vivo* en un sistema vegetal, pero se han realizado aproximaciones para determinar posibles modificaciones postraduccionales que la quinasa pueda ejercer sobre la enzima mitocondrial. Transformaciones transitorias en protoplastos de ambas proteínas fusionadas a diferentes epítomos, muestran un cambio en la movilidad de las diferentes isoformas de MnSOD, conversión hacia formas más ácidas, cuando es cotransformada con la quinasa, sugiriendo que ésta provoca su fosforilación. La detección de esta proteína fosforilada en humanos y patata (Hopper et al., 2006; Bikova et al., 2003) apoya nuestra hipótesis sobre la naturaleza de esta modificación postraducciona. Resulta interesante que tres isoformas aparecen tanto en la forma procesada como la no procesada, lo cual podría indicar que la fosforilación se produce antes de entrar en mitocondria, aunque no excluye que tenga lugar dentro, pero antes del procesamiento del péptido señal. Esta última hipótesis es quizás menos probable, si se tiene en cuenta que el plegamiento de la proteína es a veces necesario para el reconocimiento por la quinasa, y éste tiene lugar en muchas proteínas, una vez se ha eliminado el péptido señal (Stojanovski et al., 2003). La fosforilación de algunas proteínas con localización dual se ha descrito como un mecanismo para la dirección a mitocondrias (Hindupur et al., 1999). Además, la fosforilación en el extremo N-terminal de la sacarosa sintasa, sustrato *in vitro* de una quinasa con características a SnRK1, provoca un cambio en la afinidad de esta proteína con membranas (Subbaiah et al., 2006).

El análisis de la actividad de MnSOD muestra que no existen variaciones en función de la coexpresión con ZmSnRK1b. Este resultado no excluye que ZmSnRRK1b provoque un cambio de actividad MnSOD, ya que podría realizarlo en otras condiciones de estrés celular no analizadas. No hay que olvidar que, debido a que ZmSnRK1b se está expresando en un sistema heterólogo, tal vez no reciba el estímulo adecuado para su activación. La localización subcelular de MnSOD confirma su presencia en mitocondrias como se predice del análisis *in silico*. No obstante, se encuentran agregados de mayor tamaño, que no corresponden a mitocondrias, según la tinción con el colorante específico Mitotracker (ver figura 50). Otros autores han descrito la presencia de formas MnSOD en peroxisomas (del Río et al., 2003).

Aunque no se ha podido determinar la interacción de las subunidades β y γ identificadas en este trabajo con ZmSnRK1a/b, su existencia, así como la diversidad de isoformas presente en otras especies vegetales, sugiere el desarrollo en plantas de mecanismos reguladores más complejos, para responder a señales de estrés ambientales o metabólicas a través de componentes SnRK1.

La identificación de posibles interactores de ZmSnRK1b es un paso adelante para el avance en el estudio de las múltiples funciones que esta quinasa, específica de cereales, puede ejercer en la célula. En la figura 51 se resumen algunos de los procesos en que SnRK1 se ha implicado en plantas, y se añaden algunas funciones en las que podría estar implicada, según su interacción con las proteínas identificadas en este trabajo, y la recopilación de información procedente de organismos más lejanos como humanos o levadura, con los que, como se ha demostrado, presenta un elevado grado de conservación.

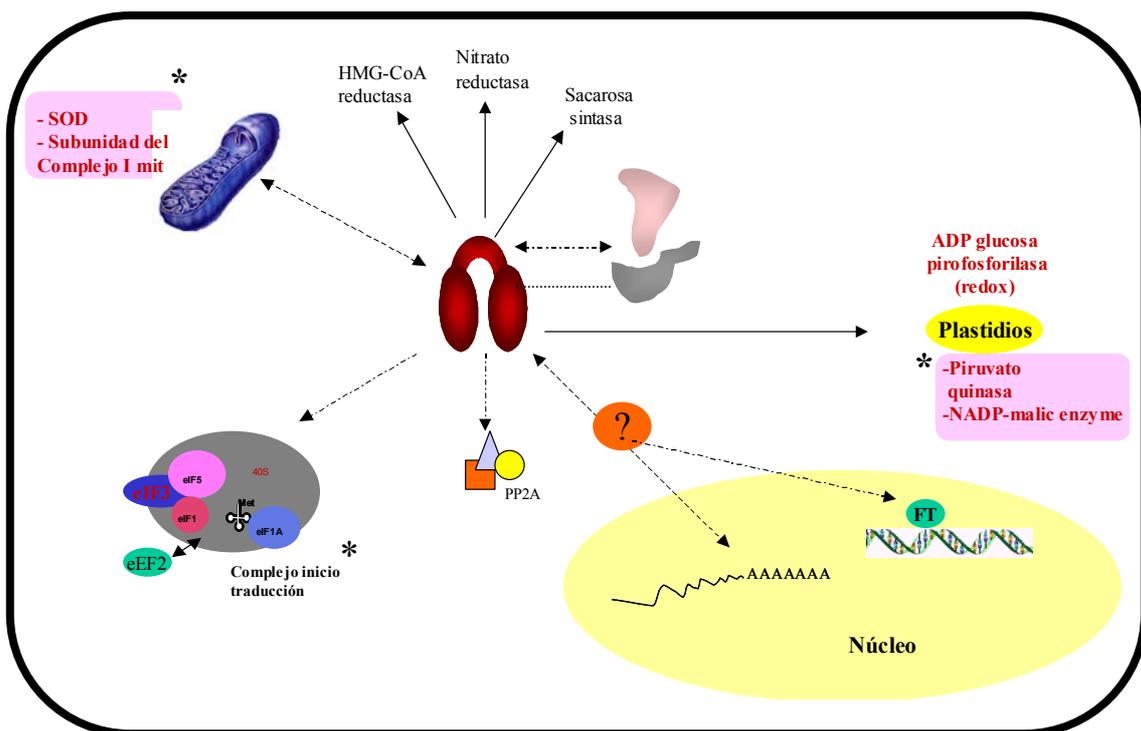


Figura 51. Esquema de proteínas que interaccionan con SnRK1 en células vegetales. Las flechas discontinuas indican la interacción de ZmSnRK1b con diferentes proteínas, según estudios de doble híbrido realizado en este trabajo. Con un asterisco se indican posibles funciones que ZmSnRK1b podría modular, según las interacciones de doble híbrido procedentes de este trabajo. La localización subcelular de ZmSnRK1b y ZmAKIN β en núcleo corrobora el papel de este complejo en la regulación génica. ; FT: Factores de transcripción; PP2A: proteína fosfatasa 2A.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.1 Material vegetal y tratamientos

Se han utilizado semillas de diferentes estadios y plántulas de la línea homocigótica W64A de maíz. Las semillas se han esterilizado en etanol durante 5 min, seguidos de 10 min en hipoclorito de sodio al 5% y de varios lavados con agua destilada. Las plantas de maíz han sido crecidas en un medio MS 0.5x, en condiciones hidropónicas, con un fotoperíodo de 16 horas de luz a 28°C y 8 horas de oscuridad a 26°C. Los tratamientos se han realizado en plántulas de 5 días.

Para los experimentos de coimmunoprecipitación se ha utilizado la línea celular LT87 de *Arabidopsis thaliana* (Axellos et al., 1992). Para el mantenimiento de la suspensión celular se diluye cada semana 10ml de cultivo en 60 ml de medio nuevo LT87.

1.2 Cepas bacterianas

<i>E. coli</i>	
DH5 α	Amplificación de DNA plasmídico (Hannahan, 1983)
TOP 10	Amplificación de DNA plasmídico (Invitrogen)
BL21(DE3)	Sobreexpresión de proteínas (Stratagene)

1.3 Cepas de levadura

AH109	MATa, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1 _{UAS} - GAL1 _{TATA} -HIS3, GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} - ADE2, URA3::MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacz
MCY1846 <i>snf1</i>	MATa, snf1 Δ 10, lys 2-801, ura3-52, SUC2 (Celenza and Carlson, 1989)
MCY1853 <i>snf4</i>	MATa, snf4 Δ 2, his 4-539, lys 2-801, ura 3-52, SUC2 (Celenza and Carlson 1989)

1.4 Medios

1.4.1 Medios bacterianos

Medio LB:

Bacto triptona	10g/l
Extracto de levadura	5g/l
NaCl	10g/l

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH. Para medio sólido añadir 15g/l de bacto-agar.

Autoclavar 20' a 120°C.

Medio SOB:

Bacto triptona	20g/l
Extracto de levadura	5g/l
NaCl	0.584g/l
KCl	0.1866g/l
MgSO ₄	5g/l

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH y autoclavar 20' a 120°C

1.4.2 Medios de levadura

YPD:

Extracto de levadura	10g/l
Peptona	20g/l
Glucosa	20g/l

Ajustar el pH a 5.7 con NaOH. Para medio sólido añadir 20g/l de bacto-agar. Autoclavar 15' a 120°C

Para la selección de levadura transformada se utiliza el medio mínimo –SD, suplementado con todos los aa, excepto para los que queremos seleccionar. Este medio contiene una fuente nitrogenada sin aa (yeast nitrogen base without aminoacids), y una fuente de carbono (galactosa, glucosa, etanol o glicerol, según proceda). Para la preparación de los medios selectivos, se prepara SD y se añade solución Dropout que contiene los nutrientes esenciales, aminoácidos y nucleótidos. Hemos utilizado dropouts que carecen de los aa : His, Leu, Trp y Ura (-HLTU) o His, Leu, Trp y Ade (-HLTA). La composición para preparar el medio –LT, que selecciona los transformantes para los dos plásmidos utilizados en doble híbrido, se detalla a continuación. Todos los demás SD, se preparan de la misma manera, añadiendo los aminoácidos específicos.

SD (-LT)

Yeast nitrogen base without aa	6.7g/l
Glucosa	20g/l
DOmedium (-HLTU)	0.6g/l
L-Uracilo 100x (2mg/ml)	10ml
L-Histidina 100X(2mg/ml)	10ml

Ajustar el pH:5.8 on KOH y autoclavar 15' a 120°C.

Para otros SD, se preparan soluciones stock 100x de aminoácidos: Leu (20mg/ml); Ade (2mg/ml); Trp (2mg/ml).

1.4.3 Medios de plantas

Medio de cultivo Arabidopsis

MS(con vitaminas)	4.2 g/l
Sacarosa	3g/l

Ajustar el pH:5.8 con KOH y autoclavar 120°C, 20'. Añadir 0.9mg/ml NAA

Medio MS para maíz (4x)

MS	8.8g /l
MES	2g/l

Ajustar el pH: 5.8 con KOH y autoclavar 120°C, 20'.

1.5 Librería de cDNA , plásmidos y construcciones**1.5.1 Librería de doble híbrido de embriones de maíz**

Para el rastreo de doble híbrido se ha utilizado una librería de embrión joven de maíz. El cDNA se encuentra fusionado al dominio de activación AD del vector pACT2, en las dianas EcoRI/XhoI. Esta librería fue cedida por el Dr. JM Casacuberta y procede de Köln University (Dr. Werr)

1.5.2 Plásmidos utilizados

Plásmido	Función y referencia o fuente
PTZ57R	Clonaje de productos PCR (Fermentas)
PCR2.1	Clonaje de productos de PCR (Invitrogen)
PGBKT7	Ensayo de doble híbrido (dominio de unión a DNA) (Clontech)
pGBT9	Ensayo de doble híbrido (dominio de unión a DNA) (Clontech)
PGAD 424	Ensayo de doble híbrido (dominio de activación) (Clontech)
pYES2	Sobreexpresión en levadura
PNEV	Sobreexpresión en levadura
Pet 28a/c	Sobreexpresión en <i>E.coli</i> de proteínas con cola de histidinas (Novagen)
pGEX4T-1	Sobreexpresión en <i>E.coli</i> de proteínas fusionadas a GST (Pharmacia)
pet 201	Sobreexpresión en <i>E.coli</i> de proteínas fusionadas a tioredoxina y cola de histinas
PC1302	Transformación estable /transitoria en plantas, de proteínas fusionadas a GFP (pCAMBIA)
ppK100	Transformación transitoria en cebolla de proteínas fusionadas a GFP(derivado de pEGFP1, Clontech).
pGJ1425	Transformación transitoria en cebolla de proteínas fusionadas a dsRED
PMENCHU	Transformación transitoria en células vegetales (Ferrando et al., 2000)
PLOLA	“
PILY	“
PGIGI	“

1.5.3 Construcciones utilizadas

Construcción	Descripción clonaje
Experimentos 2h	
PGBKT7-ZmSnRK1b	Clonado con Sma I / BamHI
PGBKT7-ZmSnRK1a	Clonado con EcoRI
PGBKT7- Zmy1	Clonado en BamHI
PGAD424-Zmβ1	Clonado en EcoR I / SalI
PACT2-Atβ2	<i>Lumbreras et al, 2001</i>
PGAD 424-Zmy1	Clonado en BamHI
PGAD424-Zmy2	Clonado en BamHI
PGBT9 ZmSnRK1b-KD	Clonado en SmaI / BamHI
PGBT9-ZmSnRKbRD	Clonado en BamHI
PGBT9-Kda-RDb	Clonado en EcoRI/ BamHI
PGADA424-ZmAKINβγ1	<i>Lumbreras et al , 2001</i>
PGAD424-ZmAKINβγΔCt	<i>Lumbreras et al. 2001</i>
PGAD424- ZmAKINβγΔKis	<i>Lumbreras et al, 2001</i>
Complementación levadura	
PYES-ZmSnRK1b	Clonado en BamHI
PNEV-ZmSnRK1a	Clonado en EcoRI
PNEV-Zmy1	Digestión parcial con EcoRI a partir de PCR2.1
PNEVZmy2	Filling a partir de BamHI
Sobreexpresión en <i>E.coli</i>	
Pet 28a-ZmSnRK1b	Clonado en BamHI
PGEX4t-1-ZmSnRK1b	Clonado en BamHI
PGEX4t-1KDb	Clonado en BamHI
Pet201-ZmSNRK1b	Filling a partir de NcoI/SmaI
Pet201-ZmsnRK1a	Clonado en EcoRI
PZEX-Kis	<i>Lumbreras et al, 2001</i>
Pet28c-142h	Clonado en EcoRI/XhoI
Pet28c-12h	Clonado en EcoRI/XhoI
Transformación transitoria protoplastos/cebolla	
PILY -ZmSnRK1b (1)	Clonado en NcoI/SmaI
PILY -ZmSnRK1b (2)	Clonado en BamHI
PILY-ZmSNRK1a	Clonado en EcoRI
PILY-ZmAKINβγ	Clonado en NcoI/SmaI
PLOLA-ZmAKINβγ	Clonado en NcoI/ SmaI
PMENCHU-ZmAKINβγ	Clonado en EcoRI
PGIGI-ZmAKINβγ	Clonado en EcoRI
PLOLA-Zmβ1	Clonado en NcoI/BglII
PLOLA-Zmy1	Clonado en NcoI/BglII
PC1302-ZmSNRK1b	Clonado en NcoI / BglII
PC1302-ZmSnRK1a	Clonado en NcoI
PC1302-ZmAKINβγ	Clonado en BglII/SpeI
ppk100 -14-2h	Clonado en NcoI
PLOLA-14	Clonado en NcoI

1.5.4 Oligonucleótidos utilizados

Utilidad

Secuencia

Clonaje

ZmAKIN $\beta\gamma$ BglII	5'cca gat ctg atg ttc tcg cac 3'
ZmAKIN $\beta\gamma$ SpeI	5'act agt caa gct cag caa gaa ctt g 3'
ZmAKIN $\beta\gamma$ Ct Eco5	5'gaa ttc agg atg aac atg gat gtg g 3'
ZmAKIN $\beta\gamma$ Eco5	5'gaa ttc atg ttc tcg cac ggc gct 3'
ZmAKIN $\beta\gamma$ Eco3	5'gaa tcc tca caa gct cag caa gaa ctt 3'
ZmAKIN $\beta\gamma$ Nco5	5'cca tgg cga tgt tct cgc acg gcg c 3'
ZmAKIN $\beta\gamma$ SmaI3	5'ccc ggg caa gct cag caa gaa ctt g 3'
ZmAKIN $\beta\gamma$ Nco3	5'cca tgg agc tca gca aga act tga a 3'
Zma 3	5' aat gaa cta tca cta gca gac g 3'
Zma 5	5' aag gtt gac ctg tcg agg gcc 3'
ZmSnfIb Sma	5' ccc ggg tat gga tgg aag tag 3'
ZmSnfIb BamHI3	5' gat cct ttc ggt tat tca tca cc 3'
ZmSnfIb BamHI3-2	5' gga tcc cta tag aac cct aag ctt gg 3'
ZmSnfIb BamHI5-1	5' cgg atc cat gga tgg aag tag taa agg 3'
ZmSnfI BamHI 5-3	5' gga tcc aat gga tgg aag tag taa ag 3'
ZmSnfIb BamHI3-2	5' cgg atc ctc tag aac cct aag ctt gg 3'
ZmSnfIb Nco5	5' cca tgg cga tgg atg gaa gta gta aag g 3'
ZmSnfIb BglII3	5' cag atc tac tag aac cct aag ctt gg 3'
ZmSnfIbk3BamHI	5' gga tcc acc gat tgt cca ata gta aat 3'
ZmSnfIbk 5BamHI	5' gga tcc ggt tta gag caa cta gtg g 3'
Zmo 5	5' tct ccc ctg cgg cga ggt aca cg 3'
Zmo3	5' tac tct caa ggc agc cag gac tcc 3'
ZmSnfIa Eco5-1	5'gaa ttc atg gag gga gcg gga aga g 3'
ZmSnfIa Eco3-1	5'gaa ttc tca tgt cat cag gct caa aga 3'
ZmSnfIa Eco 5-2	5'gaa ttc gat gga ggg agc ggg aag ag 3'
ZmSnfIa Eco 3-2	5'cga att ctc aag aac tct cag ctg c 3'
ZmSnfIakBam3	5'acg gat cct att gtc cat gag taa ata 3'
ZmAKIN β 1EcoRI	5'gaa ttc atg gga aac gcc agc ggc 3'
ZmAKIN β 1XhoI	5'ctc gag tcg ttc gat ggg ttt gta 3'
ZmAKIN β 1NcoI5	5'cca tgg cga tgg gaa acg cca gcg gc 3'
ZmAKIN β 1BglII3	5'aga tct tgc ttc gat ggg ttt gta c 3'
ZmAKIN γ 1BamHI5	5' gga tcc aga tg gaga gcc cgc gca gc 3'
ZmAKIN γ 1BamHI3	5' gga tcc tac ggt gct gtt tgc agg 3'
ZmAKIN γ 1NcoI5	5'cca tgg cga tg gaga gcc cgc gca gc 3'
ZmAKIN γ 1BglII 3	5'aga tct tac ggt gct gtt tgc agg 3'
Zmy2BamHI5	5' gga tcc aca tgg atc aac ctg agg aa 3'
Zmy2BamHI3	5' gga tcc cgc tac aga aaa get c 3'
142h NcoI5	5'cca tgg gca tgg ctc tcc gca ccc tgg c 3'
142h NcoI3	5'gcc cat ggc agc aag aac att ttc gta c 3'

Secuenciación

St2I	5'gat ata tat gtt gtg atg g 3'
StI	5'ggc aac tgt tgc ata tta 3'
Snf1I	5'atg gag tat gtt aaa tct gga 3'
26I	5'ttg ata acg tgg agg agc tgc 3'
262I	5'atc cag ggc aca gca tca 3'
dk1	5'cga tga tga aga tac ccc ac 3''

Sondas UTR y RT-PCR

RDa5	5'tga gcc tga cat gat tgg ctt 3'
RDa3	5'tgc tag gac gac ccc ctt aa 3'
RD b5	5'tag tgg tct acc atg tgc a 3'
RD b3	5'cgt aac gtt tta gtt caa aaa tga ac 3'

1.6 Anticuerpos utilizados

Anticuerpos primarios:

- **α -KIS**, anticuerpo policlonal producido en conejo contra el dominio KIS de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ (este trabajo). Dilución de trabajo 1:1000
- **α -ZmAKIN $\beta\gamma$** , anticuerpo policlonal producido en conejo contra la proteína completa (este trabajo). Dilución de trabajo 1:250
- **α -His**, anticuerpo monoclonal producido en ratón contra epítipo de 6 histidinas(Novagen) Solución de trabajo 1:1000
- **α -GST**, anticuerpo producido en cabra contra la proteína GST (Amersham)
- **α -c-myc**, anticuerpo monoclonal producido en ratón contra un epítipo de la proteína humana p62^{c-Myc}. (Sigma). dilución de trabajo 1:1500
- **α -HA**, anticuerpo monoclonal producido en rata contra un epítipo derivado la proteína hemaglutinina.(Roche) Dilución de trabajo 1:2000

Anticuerpos secundarios:

- Donkey antirabbit immunoglobulines, HRP-conjugated (Amersham)
- Donkey antimouse immunoglobulines, HRP-conjugated (Amersham)
- Rabbit antigoat immunoglobulines, HRP-conjugated (DAKO)

2. MÉTODOS

2.1 Preparación y transformación de células competentes

Para la preparación de células competentes de *E.coli* se ha utilizado el método de CaCl₂ tal y como describen Lederberg and Cohen (1974).

La transformación se ha realizado mediante choque térmico. Para ello, una alícuota de 100 µl se descongela en hielo y se añade el DNA a transformar, se mezcla por pipeteo y se deja incubar en hielo durante 30'. El choque térmico se realiza pasado este tiempo incubando la mezcla 1'30'' a 42 °C y 10' más en hielo. Posteriormente se añaden 800 ul de LB y se incuban una hora a 37°C en agitación. Finalmente se recuperan las células mediante centrifugación (2', 6000 rpm), se plaquean en medio LB con el antibiótico apropiado y se incuban a 37°C toda la noche.

2.2 Extracción y purificación de DNA plasmídico de E.coli (pequeña escala)

A partir de 3ml de cultivo bacteriano crecido toda la noche en LB + antibiótico:

1. Centrifugar todo el cultivo a 13000 rpm 1'
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 150 µl de solución I utilizando vórtex.
3. Añadir 300 µl de solución II, mezclar por inversión y dejar 5' a TA. Es importante no vortear ni dejar más tiempo la solución ya que esto podría provocar la rotura del DNA genómico que puede confundirse posteriormente con el plasmídico.
4. Añadir 225 µl de solución III y mezclar vigorosamente pero sin utilizar vórtex.
5. Dejar en hielo 10', hasta ver un precipitado blanco que corresponde a restos celulares, proteínas y SDS.
6. Centrifugar a 13000 rpm durante 10' a T.A
8. Recuperar el sobrenadante y añadir 675 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1)
9. Vórtex y centrifugar a 13000 rpm 5'
10. Recuperar la fase acuosa y añadirle 675 µl de isopropanol, mezclar con vórtex y centrifugar 13000 rpm 15'.
11. Lavar el pellet con 1ml de etanol al 70% y centrifugar 13000 rpm, 5'
13. Dejar secar el pellet y resuspender en H₂O mQ con RNAsa 100 µg/ml

- **Sol I:** 50mM glucosa, 25mM tris-HCl pH 8, 10mM EDTA
- **Solución II:** 0,2N NaOH, 1% SDS
- **Solución III:** 3M acetato de potasio pH 4,8.

2.3 Extracción y purificación de DNA a gran escala

Para la obtención del DNA plasmídico a gran escala se ha utilizado el kit de maxipreparaciones de Promega y se han seguido las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del DNA es óptimo para experimentos como la transformación de protoplastos, que requieren gran cantidad de DNA y de una pureza elevada

2.4 Electroforesis de DNA

La separación de fragmentos de DNA se realiza mediante electroforesis en geles de agarosa. Para la preparación del gel se disuelve en el microondas la cantidad necesaria de agarosa en 100ml de tampón TAE 1x. Para fragmentos de entre 3000 pb y 800 pb se utiliza un 1% agarosa, mientras que para visualizar bandas de mayor tamaño se reduce a un 0.8% y para bandas menores se incrementa a un 1.5 %. La solución se deja enfriar hasta $\cong 55^{\circ}\text{C}$ y se añade 0.100 $\mu\text{g/ml}$ de EtBr. Como marcador de PM se ha utilizado el DNA del bacteriofago λ digerido con PstI. Las muestras de DNA se mezclan con el volumen de tampón de carga necesario para conseguir una concentración 1x. La electroforesis se realiza con un voltaje entre 50-100V y se visualiza y fotografía bajo luz ultravioleta (254nm).

- **10x tampón de carga:** 0.25% azul de bromofenol, 0.25% de cianol de xileno, 50% de glicerol en 1X TE
- **50x tampón TAE:** 2M Tris-Acetato pH 8.1, 0.1 M EDTA.

2.5 Digestión, defosforilación, purificación y ligación

Digestión: Por cada μg de DNA a digerir se ha utilizado 5U de enzima , en el apropiado tampón de digestión y con un tiempo de incubación de 2-4h a 37°C . Si el vector es digerido con un único enzima, para evitar la religación se procede a su defosforilación .

Obtención de extremos romos: por cada μg de DNA se añade 1U de T4DNA polimerasa y se incuba la muestra 15' a 37°C . La reacción se para añadiendo EDTA a una concentración final de 10mM e inactivando a 75°C 10', seguido de extracción fenólica.

Defosforilación: Se diluye la reacción de digestión hasta 80 μl añadiendo 8 μl de tampón fosfatasa 10x , 1 μl de fosfatasa alcalina y la cantidad de H_2O mQ necesaria. La reacción se incuba a 37°C durante 45'-1h. La fosfatasa se inactiva incubando 10' a 75°C .

Purificación: una vez se han separado en gel de agarosa las bandas digeridas y defosforiladas se han cortado bajo luz UV y purificado usando el kit Gel Extraction de la casa Qiagen, y siguiendo estrictamente las instrucciones del kit.

Ligación: la relación de inserto: vector utilizada ha sido 3:1. La reacción se realiza en un volumen final de 20 μl , utilizando 1-5U de T4-DNA ligasa en el tampón apropiado. La incubación se realiza toda la noche en un baño de agua con un gradiente de temperatura de 10 a 22°C .

2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de DNA o modificación de extremos con el objetivo de facilitar el clonaje, se ha realizado PCR, generalmente en un volumen de 50 μl con la siguiente composición:

Tampón PCR 10X:	5 μl
MgCl ₂ 25mM:	5 μl
dNTPs 10mM:	2,5 μl
oligonucleótido1(100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$):	2 μl
oligonucleótido2 (“ ”):	2 μl
Taq polimerasa (5U/ μl):	0,5 μl

- **Tampón de PCR:** Tris HCl 200mM pH 8,4, KCl 500mM

2.7 RT-PCR

Mediante esta reacción se han aislado las diferentes subunidades del complejo SnRK1, así como el clon entero del enzima málico.

A partir de una concentración suficiente de RNA se procede, tal como se detalla a continuación, al primer paso, que es la eliminación de posible DNA genómico contaminante:

1. En un tubo eppendorf se mezclan: 50 μg de RNA, 10 μl de tampón 10X DNAasa, 3 μl de DNAasa libre de RNA (10U/ μl) y se lleva a un volumen final de 100 μl con H₂O DEPC.
2. Incubar 10' a 37°C.
3. Eliminar la enzima mediante extracción fenólica, añadiendo 1 vol de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1).
4. Agitar en vórtex y centrifugar 1300rpm 5'
5. Recuperar el sobrenadante y añadir 0.1V de acetato sódico 3M, pH 5.8 y 2.5 V de EtOH.
6. Incubar 30' a -20°C.
7. Centrifugar a 13000 rpm 20'
8. Lavar el pellet con EtOH 70%
9. Resuspender en H₂O DEPC.
10. Cuantificar y comprobar la integridad del RNA en gel.

- **Tampón DNAasa:** 200mM HEPES pH 7.5, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂. Autoclavar.

A partir de aquí se realiza la retrotranscripción, que en nuestro caso fue utilizando la retrotranscriptasa M-MLVRT de Promega tal como sigue:

1. Se mezcla: 1-10 µg de RNA*, 4µl de first strand buffer 5x, 2µl DTT 0.1M, 2µl dNTPs10mM*, 1µl primer oligo-dT (14.6 pmol/µl)*, 1 µl inhibidor de RNAasa (RNA guard, 26.4U/µl), 1µl M-MLV RT (200 U/µl) y enrasar a 20 µl con H₂O*.

* Mezclar el RNA, los dNTPs, el oligo-dT y el H₂O, desnaturalizar 5' a 65°C, enfriar en hielo y añadir el resto de los componentes manteniendo en frío.

2. Incubar 2h a 37°C
3. Añadir 180µl de H₂O y guardar a -20°C.

Una vez obtenido el cDNA se realiza la PCR con 5-10 µl y los primers específicos

2.8 Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total se ha utilizado el reactivo Trizol de Invitrogen. Para evitar degradación por RNasas es necesario trabajar con guantes y material estéril. Los morteros donde machacamos el material, así como espátulas, se dejan 4 horas a 200°C. El material vegetal se congela directamente en N₂ líquido y se guarda a -80°C hasta su utilización. Todos los pasos de centrifugación deben realizarse a 4°C. A Partir de aquí seguimos el siguiente protocolo:

1. En el mortero, previamente enfriado con N₂ l, añadir el material y machacar hasta obtener un polvo muy fino, añadiendo continuamente más nitrógeno para evitar que se descongele la muestra.
2. A cada 150-200mg de material triturado añadir 1 ml de trizol y dejar 5' a T.A. Para el caso del grano, como tiene un alto contenido en carbohidratos se realiza una centrifugación de 10' para eliminar el material insoluble.
3. Añadir 200µl de cloroformo y agitar manualmente durante unos 15".
4. Incubar 2-3' a T.A
5. Centrifugar a 12000 g 15'.
6. Recoger la fase acuosa y precipitar el RNA añadiendo 500 µl de isopropanol.
7. Incubar 10' a T.A
8. Centrifugar a 12000 g 10'.
9. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet que contiene el RNA con EtOH al 75%.
10. Centrifugar a 7500 g 5'.
11. Secar el pellet (nunca al vacío) 5-10' como máximo y disolver en 30 µl de H₂O libre de RNasa. Para mejorar la solubilidad puede calentarse a 65°C durante 5'.
12. La concentración de RNA se mide a 260 nm. La relación OD₂₆₀/280 debe estar entre 1,8-2,0. La integridad del RNA se comprueba en un gel de agarosa.

2.9 Análisis Northern

2.9.1 Electroforesis de RNA

La electroforesis de RNA para estudios de expresión se ha realizado en geles desnaturizantes de agarosa al 1%. Para la preparación se disuelve en el microondas 1g de agarosa en 72 ml de H₂O mQ y se mezcla, una vez atemperada, con una segunda solución de 18ml de formaldehído al 37% y 10 ml de tampón MEN 10x. Las muestras de RNA se preparan mezclando 25 µl de formamida desionizada, 9 µl de formaldehído al 37%, 6 µl de tampón MEN 10X, 1 µl de BrET 1mg/ml y 10 µg de RNA total en 20 µl de H₂O. Se desnaturaliza 15' a 65°C y se mantiene en hielo hasta el momento de cargarlas.

El tampón de electroforesis es MEN 1x, el cual se añade hasta el nivel del gel sin llegar a cubrirlo. En uno de los pocillos se añade tampón de carga de electroforesis que contiene xilanocianol y azul de bromofenol para controlar la evolución del gel. Se corre durante 2- 3h a 70 V.

- **Tampón de carga 1x:** 6µl MEN 10x, 9µl formaldehído, 25µl formamida, 1 µl EtBr.
- **Tampón MEN 10x:** 200mM MOPS pH 7, 50 mM acetato de sodio, 10mM EDTA.

2.9.2 Transferencia a membrana de nylon

Después de la electroforesis, el gel de RNA se lava con H₂O durante 10' con el fin de eliminar el exceso de formaldehído. Se fotografía en luz UV para tener un control de carga y se procede a la transferencia en membrana de nylon:

1. Llenar una cubeta con 1l de tampón SSC 20X y colocar un vidrio encima.
2. Colocar tres tiras de papel Whatman 3MM sobre el vidrio de manera que entren en contacto con el tampón.
3. Colocar el gel sobre las tiras de papel y sacar las burbujas de aire que puedan quedar atrapadas ayudándonos con una pipeta de vidrio.
4. Poner unas tiras de film alrededor del gel para que éste sea lo único en contacto con la membrana.
5. Humedecer la membrana de nylon, del mismo tamaño que el gel, y colocarla encima, eliminando de nuevo las burbujas de aire de la misma manera que antes.
6. Humedecer un papel Whatman 3MM de la medida del gel, colocarlo encima y eliminar burbujas.
7. Añadir 2 papeles Whatman 3MM secos y papeles absorbentes de manera que forme una columna.
8. Colocar sobre la columna de papel un cristal y un peso no mayor de 1 kg para hacer presión y tener un buen contacto.
9. Dejar transferir toda la noche.
10. Al día siguiente, se recoge la membrana se comprueba en UV que se ha producido la transferencia y se fija en el UV-Stratalinker 2400 (1200µJ x 100,1').

- **20X tampón SSC:** 300mM citrato de sodio pH 7, 300 mM NaCl

2.9.3 Hibridación de ácidos nucleicos.

Marcaje y purificación de sonda

El marcaje se ha realizado utilizando el Kit Random Primed DNA labelling de Roche tal y como se detalla:

1. Se diluyen 50-100 ng de DNA en 12 µl de H₂O.
2. Se desnaturaliza el DNA durante 10' a 100°C
3. Se pone en hielo y se añade 1 µl dATP, 1 µl dTTP y 1 µl dGTP, a una concentración de 0.5 mM.
4. Se añaden 2 µl del mix de hexanucleótidos , 2 µl de α³²P-dCTP y 1 µl de enzima Klenow 2U/ µl. Se incuba durante 1h a 37°C
5. Se añaden 80 µl de TE .

A partir de aquí se procede a la purificación utilizando el kit ProbeQuant TM G-50 micro columns de Amersham:

1. Se centrifuga una columna de purificación 1' a 3000 rpm.
2. Se coloca la columna sobre un nuevo eppendorf y se le añade la sonda.
3. Se centrifuga a 3000 rpm durante 2' y se recupera el eluyente.
4. Se desnaturaliza durante 10' a 100°C.

Hibridación de ácidos nucleicos

1. La membrana con el RNA fijado se deja incubar a 65°C y en agitación durante un mínimo de 2h con solución hibridación.
2. Se cambia la solución de hibridación y en un volumen de aproximadamente 20ml se añade la sonda marcada.
3. Se deja hibridar toda la noche a 65°C y en agitación.
4. Se elimina la solución de hibridación y se añade solución de lavado.
5. Se incuba a 65°C durante 30'.
6. Se realizan un total de 4 lavados.
7. Se comprueba en las zonas donde no hay RNA que la radioactividad sea baja. Si es necesario repetir el lavado.
8. Sellar la membrana dentro de una bolsa de plástico y exponer en *Phosphorimager*

- **Solución de hibridación:** 125 mM tampón fosfato pH 7.2, 7% SDS, 1mM EDTA
- **Solución de lavados:** 40 mM tampón fosfato pH 7.2, 2%SDS, 2mM EDTA.

Para la deshibridación de membranas se realizan lavados con H₂O hirviendo y SDS al 0.1%, durante 10-15'

2.10 Métodos generales de análisis y purificación de proteínas

2.10.1 Preparación de extractos proteicos

Los extractos proteicos de tejido o semillas se obtuvieron mediante la homogenización del tejido en mortero con nitrógeno líquido. Para 5-6 plántulas de maíz se añaden 200 µl de tampón de extracción, se vortea durante 30" y se centrifuga a 12000 rpm 10 'a 4°C para eliminar los restos celulares. Se recupera el sobrenadante y se cuantifica mediante el método Bradford para posteriores análisis.

- **Tampón de extracción:** 50mM Hepes pH 7.4, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 10mM DTT, 10mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 50 mM β-glicerofosfato, 1mM PMSF, 10 µM Leupeptina, 1µg/ml Aprotinina, 10 µg/ml Pepstatina

2.10.2 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se ha utilizado el método de Bradford (1976), el cual se basa en el cambio de absorbancia que tiene lugar cuando una solución ácida de Comassie brilliant Blue G-250 se une a las proteínas. El método seguido es el siguiente:

1. Se realiza una serie de patrones con una concentración de proteína conocida (BSA).
2. El volumen de proteínas a cuantificar se lleva a un volumen final de 800 µl de H₂O.
3. Se añade a cada muestra, incluido patrones, 200 µl de reactivo Bradford (Bio-Rad).
4. Se incuba de 10 a 45' a T.A y se mide la absorbancia a 595nm.
5. A partir de una recta patrón realizada con concentraciones crecientes de BSA (0.5 µg-20 µg) se interpola la concentración de proteína de nuestras muestras.

2.10.3 Electroforesis monodimensional SDS-PAGE

La electroforesis en gel desnaturizante de SDS/poliacrilamida se ha realizado en aparatos de Mini-protean-II/III (Biorad) tal como se describe en Goday et al. 1994. utilizando un porcentaje de acrilamida adecuado según el tamaño de la proteína, (normalmente 12.5%). La composición de los gels se detalla a continuación:

	Gel separador (10ml)			Gel concentrador (2ml)
	15%	12%	10%	
Tampón gel concentrador(ml)	-	-	-	1
Tampón gel separador(ml)	2,5	2,5	2,5	-
Acri:bisacrilamida (30:0.8)(ml)	3,75	3,13	2,5	0,5
H ₂ O(ml)	3,75	4,38	5	2,25
Temed (µl)	5	5	5	6
APS15%(p/v)(µl)	40	40	40	40

- **Tampón del gel separador:** 1,5M Tris-HCL, pH 8.8, 0,4%SDS
- **Tampón del gel concentrador:** 0,5M Tris-HCL pH 6.8, 0,4%SDS
- **Tampón de electroforesis 10x:** 19,2M glicina, 2.5M Tris-HCl, pH 8.7, 10 %SDS

Una vez separadas se tiñen o transfieren según proceda.

2.10.4 Electroforesis bidimensional

Para la separación de proteínas según el PI, se ha utilizado el sistema Ettan IPGPhor de Amersham Pharmacia. En la primera dimensión se han utilizado geles comerciales Dry-Strips de 7cm (pH 3-11), también de Amersham. Los pasos a seguir son:

1. A 45µl de extracto proteico (apartado 2.11.3) añadir 77µl de tampón de rehidratación, 2µl de De-Streak reagent y 1µl de IPG3-11(volumen final de muestra 125µl)
2. Cargar en los sarcófagos y añadir el gel dry-Strip
3. Cubrir con aceite y tapar.
4. Aplicar el programa de separación de proteínas por su carga (pI).

Pasos	tiempo	voltaje
Rehidratacion	6 h	0 V
Paso 1	6 h	30 V en un solo paso
Paso 2	1.5 h	500 V en un solo paso
Paso 3	1.5 h	1000 V en un solo paso
Paso 4	7 h	5000 V en un solo paso

Cuando finaliza el programa se congelan a – 80 °C los strips hasta su enfoque, para la segunda dimensión (mínimo 1 hora).

Para la segunda dimensión, separación por masa, es necesario equilibrar los strips :

1. Incubar 15' con tampón de equilibrado + 10mg/ml DTT
2. Incubar 15' con tampón de equilibrado +25mg/ml Iodoacetamida.
3. Lavar con H₂O_{dd}

Una vez equilibradas, se montan en geles SDS-PAGE al 12% y se sellan con agarosa al 1%(disuelta en tampón de electroforesis)

- **Tampón de rehidratación:** 7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS, 0.5% IPGBuffer, 0.02% Bromofenol
- **Tampón de equilibrado:** 50mM Tris-HCl pH 8.8, 6M urea, 30% glicerol (v/v), 2% SDS (v/v), azul de bromofenol.

2.10.5 Transferencia de proteínas a membranas PVDF

Una vez las proteínas se han separado mediante SDS-PAGE se realiza la transferencia a membranas de PVDF para la posterior inmunodetección. La transferencia se realiza en un sistema líquido de BioRad. Las membranas se activan previamente en metanol durante 30", se lavan durante 5 'en H₂O y se equilibran en tampón de transferencia durante 10-15'. La transferencia se realiza a 4 °C y 100V durante 1h, o a 30 V o/n.

Las membranas se tiñen con solución rojo Ponceau para comprobar la transferencia y marcar las bandas correspondientes a los marcadores moleculares. Posteriormente se destiñen con PBS1x y se procede a la inmunodetección.

- **Tampón de transferencia:** 48mM Tris Base, 39mM glicina, 20% metanol
- **Solución rojo de Ponceau:** 0,1% rojo de Ponceau, 1% ácido acético, 150 mM NaCl.

2.10.6 Inmunodetección

Una vez la membrana se ha desteñido totalmente se procede a la inmunodetección con anticuerpos específicos y cuya concentración de trabajo se detalla en el apartado de material.

1. Se incuba la membrana en solución bloqueante 1h a T.A (o toda la noche a 4°C) con agitación suave.
2. Se cambia la solución bloqueante y se añade el anticuerpo primario específico. Se incuba 2-4 h a T.A o (o toda la noche a 4°C).
3. Lavar 3 x 10 'con PBS-0.05% Tween
4. Incubar la membrana 1 h a T.A con el anticuerpo secundario adecuado en solución bloqueante.
5. Lavar 3 x 10' con PBS y se procede a la detección.

Todos los anticuerpos secundarios utilizados tienen conjugada la peroxidasa por lo que el revelado se realizó por quimioluminiscencia, en ensayos ECL utilizando el kit Supersignal de la casa comercial Pierce, tal y como se detalla en el manual.

2.10.7 Tinción de geles con azul de Coomassie

Una vez separadas en SDS-PAGE las proteínas se fijaron y tiñeron con una solución de Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,05% en 50% metanol y 10% ácido acético, durante 15'. Posteriormente se realizaron lavados sucesivos con 30% metanol, 10% ácido acético hasta que el fondo quedó transparente.

2.10.8 Tinción de geles con plata

Para el análisis de las fracciones purificadas del dominio KIS se tiñeron los geles con plata por su mayor sensibilidad. La siguiente tabla resume los pasos seguidos:

Etapa	Tiempo
Fijación 50 % metanol, 12 % ác. acético, 0.05% formaldehido 37%	15'
Lavados 30% etanol	15'(x3)
Pretratamiento 0.02% Na ₂ S ₂ O ₃	1'
Lavados H ₂ O mQ	20''(x3)
Impregnación 0.02 %AgNO ₃ 0.075% formaldehido	20'
Lavados H ₂ O mQ	20''(x2)
Revelado 6%Na ₂ CO ₃ 0.05% formaldehido al 37%	5'
Parada Solución de fijación	15'

2.10.9 Expresión y purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST

Se utilizaron construcciones con el dominio KIS y la proteína AKIN βγ fusionadas a GST en el vector pZEX. Para la expresión de ZmSnRK1b, así como del dominio quinasa, se utilizó el vector PGEX4T-1. La expresión proteica en estos plásmidos se realiza bajo el control del promotor *tac*, que es inducido por el análogo de lactosa IPTG. Ambos vectores contienen además el motivo de reconocimiento de trombina que permite la posterior liberación de la proteína de la GST.

El protocolo general para la expresión y purificación de las proteínas recombinantes es el que se detalla a continuación con algunas modificaciones, como el tiempo de inducción o los detergentes usados, debidas a la solubilidad de cada proteína:

1. Transformar células de E. coli BL21 con el plásmido de interés
2. Inocular una única colonia transformada en 25 ml de LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml) y dejar crecer on a 37°C y 250 rpm.
3. Diluir el cultivo 1/50 en 500 ml de LB y dejar a 37°C en agitación hasta una DO_{600nm}: 0.6-0.9.

4. Añadir IPTG 0.5 mM e incubar a 30°C durante 5 horas (este paso es dependiente de cada proteína, si ésta es soluble puede realizarse a 37°C y en menor tiempo)
5. Las células se centrifugan a 8000rpm durante 15 min a 4°C y se resuspenden en 20 ml tampón NETN añadiendo los inhibidores de proteasas PMSF, Leupetina, Aprotinina y pepstatina. Este paso y todos los que siguen a continuación deben realizarse a 4°C para evitar degradaciones de la proteína.
6. Añadir lisozima a una concentración 1mg/ ml e incubar 1 hora a 4°C.
7. Sonicar manteniendo la muestra en hielo (35W, 3 pulsos de 30") en intervalos de 30") y seguidamente centrifugar a 8000 rpm, 4°C, durante 45 minutos.

Para el caso del dominio KIS se procedió a la purificación a partir del sobrenadante. Debido a la formación de cuerpos de inclusión con la proteína entera, se procedió al tratamiento del pellet, resuspendiéndolo en NETN con un 2 % de sarcosil. Para la sobreexpresión de la subunidad quinasa, que posteriormente se utilizó en ensayos de actividad, se utilizó Tritón X-100 al 1%. Para el tratamiento del pellet se procede igual que con las células y el segundo sobrenadante se junta con el primero

1. Los sobrenadantes se pasan a una columna *glutathion sepharose* (Amersham Biosciences) previamente lavada con NETN a una relación de 1ml/ litro de cultivo.
2. Se lava la columna dos veces con NETN-0.7 M NaCl y dos veces más con NETN.
 1. El último lavado se realiza con TST + 5mM DTT.
 2. En el caso de que se quiera eluir la proteína se utiliza glutathion. Si queremos separarla de la GST, (producción de proteína para anticuerpo o purificación del dominio KIS para cristalizar) se procede a la digestión con trombina.

Una vez pasados por la columna se lava dos veces con NETN-0.7 M NaCl y dos veces más con NETN. El último lavado se realizó con TST (50mMTris, pH 8; 150mm NaCl; 0.1% Tritón X-100) + 5mM DTT. Para eluir nuestra proteína y separarla de la GST, se digirió con trombina. Se añadió un volumen de tampón de digestión (20 mM tris, pH.8; 100 mM NaCl; 2.5 mM CaCl₂) igual al volumen de resina y 10U de trombina por mg de proteína quimérica unida a la columna. Se incubó o/n a 20°C y la elución se realizó centrifugando a 500g durante 5min. La concentración de proteínas se determinó por el método Bradford y análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

- NETN : 20mM Tris, pH 8; 100mM NaCl, 1mM EDTA; 0.5% NP40
- TST: 50mMTris, pH 8; 150mm NaCl; 0.1% Tritón X-100

2.10.10 Purificación del dominio KIS mediante FPLC

Para la cromatografía de intercambio iónico con el dominio KIS, se aplicó la muestra procedente la cromatografía de afinidad, (previamente dializada contra una solución 20mM tris pH:8, 5mM NaCl) a una columna MonoQHR5/5 acoplada a un sistema FPLC (Pharmacia)

La elución se realizó a partir de un gradiente de 0 a 0.5M de NaCl. El flujo utilizado fue de 0.5ml/min y se recogieron fracciones de 0.5ml. La presencia de la proteína recombinante se siguió por absorbancia a 280nm. Muestras procedentes de esta cromatografía se concentraron hasta 200 µl por ultrafiltración (ultrafree-0.5 centrifugal filter Biomax 5K, Millipore) y se sometieron a cromatografía de filtración en gel utilizando una columna Superdex 75.

2.10.11 Expresión y purificación de proteínas fusionadas a cola de histidinas

Otro de los vectores utilizados para la expresión de proteínas han sido los de la serie pet28, que llevan una fusión de His para purificación mediante columnas de níquel, y el vector pet201 que consiste en una fusión N-terminal con tioredoxina, que favorece la solubilidad de la proteína, y una fusión de 6 histidinas en el C-terminal que permite la purificación en columna de níquel. El extracto proteico se obtiene de la misma manera que para las proteínas de fusión a GST pero utilizando un tampón de unión ligeramente diferente y a partir de aquí se realizan los pasos:

1. Añadir la resina His-Bind (Novagen) en la columna (1ml resina/ litro de cultivo) y dejar que el líquido salga de la columna, sin dejar que la resina se quede seca en ningún momento a lo largo de todo el proceso.
 2. Pasar por la columna 3x el volumen de la resina con H₂O.
 3. Pasar por la columna 5x el volumen de la resina con tampón de carga.
 4. Pasar por la columna 3x el volumen de la resina con tampón de unión.
 5. Dejar drenar la resina y añadir el extracto proteico
 6. Lavar la resina 3 veces con 10x el volumen de la resina con tampón de unión + 20mM Imidazol.
 7. Realizar eluciones de 0.5ml con tampón de unión con concentraciones crecientes de imidazol (40-300 mM) para determinar en qué fracción eluye cada proteína.
- **Tampón de carga:** 50 mM NiSO₄
 - **Tampón de unión 8x:** 4M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH 7.8.

2.10.12 Producción de anticuerpos policlones contra el dominio KIS y la proteína ZmAKINβγ

Para la obtención de anticuerpo se han inmunizado a conejos de la variedad New Zealand White, con el dominio KIS o la proteína AKIN βγ. 200µg de la proteína purificada se diluyeron en un volumen final de PBS de 500 µl. Se añadieron 500 µl de adyuvante de Freund completo para potenciar la inmunización y se vorteo fuertemente hasta la formación de una emulsión. La mezcla se inyectó por vía subcutánea de 100 µl en 100µl. La inyección se repitió 3 veces más (esta vez con el adyuvante de Freund incompleto) con un período de 15 días entre cada inyección. Dos meses después de la primera inyección se realizó la extracción de sangre del conejo. La sangre se incubó 1h a 37 °C para que coagulase y posteriormente se centrifugó a 4000rpm durante 5 min a 4°C.

2.11 Aislamiento de protoplastos y transformación transitoria en células de *Arabidopsis thaliana*.

Para un buen rendimiento en la transformación transitoria es necesario partir de una suspensión celular en buenas condiciones y en fase de crecimiento exponencial. Para el mantenimiento de la suspensión es necesario diluirla cada semana en una proporción 1:5. Si la suspensión está en condiciones óptimas, 5 días después debe contener alrededor del 10% (v/v) de células. Para un mayor rendimiento en la obtención de protoplastos, se puede diluir dos veces a la semana, una primera 1:5 y una segunda, pasados 3-4 días, 1:2. Se debe trabajar cuidadosamente debido a la fragilidad de los protoplastos, cortar las puntas con tijeras estériles y si es posible trabajar con una centrífuga sin freno.

2.11.1 Aislamiento de protoplastos

A partir de 40ml de suspensión celular de 3-5 días se procede a la obtención de protoplastos como se detalla a continuación:

1. Centrifugar las células 5' a 1000 rpm en un tubo falcon de 50ml
2. Descartar el sobrenadante y añadir 25ml de solución enzimática .Rellenar hasta 50ml con MS-GM y resuspender por inversión.
3. Transferir a dos placas de Petri (145mm); añadir 25ml de MS-GM a cada una de manera que en cada placa haya un total de 50ml.
4. Dejar en agitación suave, 25 rpm, de 3 a 5h en oscuridad.
5. Observar a microscopio si las células están digeridas (forma redonda y separadas). Si es así, transferir a un tubo falcon y centrifugar 5' a 1000 rpm
6. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 25ml de medio MS-GM.
7. Centrifugar 5' a 1000 rpm
8. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5ml de MS-sacarosa y combinar los pellets en tubos de 12ml .
9. Centrifugar 800 rpm 5'. Todos los protoplastos deben aparecen flotando en la capa superior. Se transfieren a un nuevo tubo para el contaje

2.11.2 Transformación de protoplastos

La transfección de protoplastos se realiza en una placa de petri (5.5cm Ø) tal como se detalla:

1. En el centro de cada placa se añaden 150µl de suspensión de protoplastos, rodeados de 450µl de solución PEG (repartido en 4 gotas) y de 30-40 µg de cada plásmido (a una concentración de 1 mg/ml en única gota)
2. Con la ayuda de una punta estéril se mezcla primero el DNA y los protoplastos y posteriormente el PEG, este último paso cuidadosamente para evitar un incremento rápido en la concentración de PEG.
3. Incubar 20' a T.A y oscuridad
4. Añadir 3 ml de CaNO₃ en dos pasos, mezclando bien.

5. Pasar a un tubo de 12 ml y centrifugar a 800 rpm 5'
6. Descartar el sobrenadante con pipeta y añadir 0.5 ml de MS-GM.
7. Incubar durante 24-48h a 22-26°C y en oscuridad.

- **MS-GM:** 4.g MS (Sigma)/l, 30.5g glucosa, 30.5 g manitol, pH: 5.5 con KOH.
- **MS-0.280M Sacarosa:** 4.3g MS/l, 96g sacarosa, pH:5.5 KOH
- **Solución enzimática:** 1% celulasa R10 (SERVA), 0.2 % macerozima (SERVA) en MS-GM, agitación durante 30' y esterilizar por filtración.
- **Solución PEG:** 25% PEG 6000 (SERVA), 0.450M manitol, 0.1M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, pH: 9.0 con KOH (dejar en agitación o/n y volver a medir el pH)
- **0.275M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$:** 64.94g. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

2.11.3 Aislamiento de proteínas de protoplastos:

1. Se transfieren los protoplastos a un tubo eppendorf de 1.5 ml
2. Centrifugar a 800 rpm 7'
3. Descartar el sobrenadante y añadir 400 μl de tampón de extracción
4. Vórtex durante 30", congelar en nitrógeno líquido (en este punto se puede congelar la muestra a -80°C)
5. Descongelar en hielo y vortear de nuevo.
6. Centrifugar a 13000 rpm 10'
7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo intentando no deshacer el pellet. A partir de este extracto procederemos al análisis western blot, inmunoprecipitación o ensayo de actividad.

- **Tampón de extracción de proteínas:** 25mM tris PH.7.7, 10 mM MgCl_2 , 15mM EGTA, 150mM NaCl, 15mM β -glicerofosfato, 0.1% Tween-20, 10 % glicerol 20%. Añadir justo antes de usar: 1mM DTT, 1mM NaF, 0.5mM NaVO_3 , 0.5mM PMSF, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina.

2.12 Transformación transitoria por biolística

Esta técnica se ha utilizado para el estudio de la localización subcelular de proteínas de fusión a GFP ya sea en células de cebolla o cultivo celular. Para la preparación de las muestras, en el caso de la cebolla se utiliza la epidermis y se coloca en placas con medio MS-0,2 M manitol 4 horas antes de la transformación. Durante este tiempo se procede a la preparación de las partículas de oro y la precipitación del DNA.

2.12.1 Preparación de las partículas de oro

1. Pesar 60 mg de partículas de oro de 1 μ m de diámetro y resuspender en 1ml de etanol 100%, grado HPLC.
2. Vórtex 10' y centrifugar 1' a 13000 rpm.
3. Eliminar el sobrenadante y lavar con 1ml de H₂O mQ estéril.
4. Vórtex y centrifugar de nuevo.
5. Repetir el lavado 2 veces más (pasos 3 y 4)
6. Eliminar el H₂O y resuspender el pellet en 1ml de glicerol estéril al 50%
7. Resuspender bien las partículas mediante vórtex y hacer alicuotas de 20 μ l. Si se van a utilizar en el mismo día pueden guardarse a 4 °C, para conservarlas más tiempo, hasta dos meses, se guardan a - 20°C.

2.12.2 Precipitación de las muestras de DNA

Para cada alicuota de 20 μ l:

1. Sonicar durante 2' y vortear 10'.
2. Añadir 10 μ l de la muestra de DNA (0.5 μ g/ μ l) vortear y sin dejar el vórtex, añadir secuencialmente 25 μ l de CaCl₂ 2.5M y 10 μ l de espermidina 0.1M.
3. Dar 20 golpecitos de vórtex.
4. Incubar en hielo 15'
5. Eliminar el sobrenadante y añadir 500 μ l de etanol 100% HPLC.
6. Vórtex e incubar en hielo 10- 15'
7. Spin y eliminar el sobrenadante.
8. Añadir 150 μ l de etanol HPLC y repetir los pasos 6 y 7
9. Resuspender las partículas en 15 μ l de etanol 100% HPLC y dejar en hielo hasta su uso.

2.12.3 Disparo de los microproyectiles

1. Las membranas portadoras y sus soportes se esterilizan en etanol y se dejan secar una vez montadas dentro de estos.
2. La muestra se sonica tres segundos (no debe prolongarse ya que el DNA podría dañarse) y se vortea para resuspender al máximo. Se divide en dos membranas, aproximadamente 8 μ l en cada una. Se deja secar unos minutos.
3. Esterilizar las membranas de ruptura (cebolla 900 psi, células 1100 psi) con isopropanol y dejar secar.
4. Conectar el aparato. Abrir la bombona de helio y ajustar la presión unos 200 psi superior a la de la resistencia de las membranas de ruptura. Conectar el vacío de la máquina.
5. Colocar la membrana de ruptura en su pieza portadora, situarla en el aparato en la entrada del gas helio y fijarla bien.
6. Montar las demás piezas del aparato en el siguiente orden: rejilla de parada, soporte de la membrana con la membrana portadora del DNA y tapa de

seguridad. Colocarlo en el aparato y dos posiciones más abajo la placa de petri con el material biológico.

7. Cerrar la puerta del aparato y conectar el vacío. Cuando llegue al valor de 0.1 atm, bloquear el aparato.
8. Presionar el botón de disparo y mantener hasta que la membrana de ruptura se rompa. Desactivar el vacío. Cada placa de Petri se dispara dos veces.
9. La muestra se pasa a medio MS sin manitol

- **Medio MS:** 4.7g /l MS, 20 g/L sacarosa, 0.5g /l MES, pH 5,8 con KOH, 2 g/l gelrite. Autoclave.
- **Medio MS + manitol:** medio MS + 36 g/l manitol.

Pasadas 18- 24 h las muestras se han observado en un microscopio confocal de la casa Leica TSC SP, Heidelber, Germany.

2.12.4 Tinción Mitotracker

Para el marcaje de mitocondrias se ha utilizado el reactivo Mitotracker. Se preparó una solución de colorante 200nM en medio MS. Las células se incubaron 15' en esta solución y posteriormente se lavaron brevemente en medio MS y se visualizaron directamente al microscopio.

2.13 Inmunoprecipitación de complejos AKIN $\beta\gamma$ y ensayos de actividad

Mediante este ensayo se ha aislado actividad quinasa asociada a subunidades AKIN $\beta\gamma$ utilizando el anticuerpo policlonal generado contra la proteína entera. A partir de extractos proteicos se procede tal y como se detalla:

1. 300 μ g de proteína se llevan a un volumen total de 200 μ l en tampón de extracción.
2. Se añade 1 μ l de anticuerpo AKIN $\beta\gamma$ (o de serum preinmune para el control).
3. Se incuba a 4°C y en agitación durante 4-6 h.
4. Paralelamente se prepara la resina de proteína A-Sepharosa. Para ello se disuelve la cantidad deseada de Sepharosa proteína A (teniendo en cuenta que 5mg dan un volumen final aproximado de 1ml) en H₂O, se deja sedimentar la resina y se elimina el H₂O. Se añade tampón de inmunoprecipitación en una proporción resina: tampón 1:1 y se procede de la misma manera, repitiendo dos veces.
5. Se añaden 50 μ l de resina disuelta y se incuba 2h en agitación a 4°C.
6. Se centrifuga a 3000 rpm 2'.
7. Se elimina el sobrenadante y se añade 500 μ l de tampón de inmunoprecipitación.
8. Se centrifuga a 3000 rpm 2'.
9. Se repite el proceso pero añadiendo tampón quinasa 1X.

Se lleva a un volumen final de 40 μ l y se realiza el ensayo quinasa

- **Tampón de inmunoprecipitación:** 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM Na_3VO_4 , 1mM NaF, 1mM PMSF, 10 μ M Leupeptina, 1 μ g/ml Aprotinina, 10 μ g/ml Pepstatina

2.14 Ensayo de actividad SAMS

Para el ensayo de actividad SAMS, se añaden 10 μ l de fracción purificada, o el inmunoprecipitado en el caso de extractos vegetales, a una mezcla de reacción que contiene: 4 μ l de tampón quinasa 10x, 100 μ M ATP, 8 μ l del péptido SAMS y 1 μ l de [γ - ^{33}P] ATP, en un volumen final de 40 μ l. Se incuban las muestras a 30°C durante 45'. Transcurrido este tiempo, se aplica una alícuota de 30 μ l a papeles Whatman p-81. Se realizan 3 lavados de 5' con ácido ortofosfórico 75mM para eliminar el exceso de [γ - ^{33}P]-ATP. Se realiza un lavado con acetona y se deja secar al aire. Cada papel se coloca en un vial, se añaden 3ml de líquido de centelleo y se mide la radioactividad incorporada en un contador de centelleo líquido

- **Tampón quinasa 10X:** 200mM Tris HCl pH 8, 50mM MnCl_2 , 8mM DTT

2.15 Ensayo de actividad SOD

Este método se ha utilizado para determinar la actividad MnSOD de los extractos proteicos de protoplastos transformados. Este protocolo permite la detección de proteínas con actividad superóxido dismutasa. Las muestras que hemos utilizado proceden de los extractos proteicos de protoplastos (apartado 2.11.3). Los pasos seguidos son:

1. A 30 μ l de extracto proteico añadir tampón de muestras de proteínas, sin SDS ni β -mercapto.
2. Cargar las muestras en un gel de acrilamida nativo, y correr durante 3-4 horas a 100V (el tampón de electroforesis que se utiliza no contiene SDS)
3. Una vez acabada la electroforesis, se retira el gel y se incuba en una solución de tampón fosfato 50mM, pH 7.8, y 1mM EDTA durante 30'
4. Se retira la solución de tampón fosfato y se añade la solución riboflavina -NBT y 60 μ l de TEMED
5. Se incuba 30' en oscuridad y se expone a la luz, hasta visualizar las bandas correspondientes a las actividades superóxido dismutasa

Fotografiar rápidamente, o secar protegiendo de la luz.

- **Solución de Riboflavina-NBT:** 1mg Riboflavina, 2.5 mg de NBT en 30ml de tampón fosfato 50mM, pH:7.8

2.16 Traducción y transcripción *in vitro* (TnT)

La proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ se sintetizó y marcó con 35S mediante transcripción *in vitro* con el Kit TnT[®] (Coupled Reticulocyte Lysate System) de Promega. A partir del cDNA, clonado en el vector pet 28a, que contiene un promotor T7RNA polimerasa se llevó a cabo la reacción, 90' a 30°C, según las cantidades que se indican:

Reactivo	Volumen
Lisado de reticulocitos de conejo	25 μ l
Tampón	2 μ l
T7/RNA polimerasa	1 μ l
AA(-Met)	1 μ l
RNA guard	1 μ l
DNA(0.5 μ g/ μ l)	2 μ l
Met(35S)	2 μ l
VOL.FINAL	50μl

2.17 Pull-down

Este método permite determinar interacciones directas entre dos proteínas. Se utilizó esta técnica para determinar si ZmAKIN $\beta\gamma$ era capaz de interactuar con el dominio KIS. Por su mayor solubilidad, el dominio KIS (tanto de la proteína PTP, como la subunidad ZmAKIN $\beta\gamma$) se expresó fusionado a GST, como se detalla en el apartado (2.10.9) y la proteína total, ZmAKIN $\beta\gamma$ se marcó, mediante TnT. Es necesario realizar un gel previo, con las proteínas fusionadas a GST, para determinar la concentración de cada una de ellas, para que de esta manera sean equiparables. Una vez conocidas las concentraciones se procede según:

1. En un tubo de 0.5 ml se añade 1-5 μ g de la proteína de fusión GST inmovilizada en Sepharosa. Se añade resina libre hasta un volumen final de 90 μ l.
2. Dejar sedimentar la resina y descartar el sobrenadante.
3. Añadir 180 μ l de tampón de unión
4. Incubar durante 1h a 4°C, con rotación suave.
5. Dejar sedimentar la resina en hielo y descartar el sobrenadante.
6. Añadir la transcripción-traducción *in vitro* marcada radioactivamente.
7. Incubar a 4°C, o/n.
8. Traspasar a un tubo de 1.5 ml y dejar sedimentar en hielo.
9. Retirar el sobrenadante y lavar con 1ml de tampón RIPA.
10. Mezclar bien y dejar sedimentar en hielo.

11. Retirar el sobrenadante, y repetir los pasos 9-11, 6-8 veces,
12. Añadir 20 μ l de TM1x+ β -mercapto y calentar a 95°C durante 5'
13. Cargar en un gel de proteínas SDS-PAGE
14. Teñir el gel de proteínas con azul de Coomassie y desteñir con metanol:acético .
15. Secar el gel al vacío durante 1h y exponer en *Phosphorimager*.

- **Tampón de unión:** 20mM HEPES-KOH, pH 7.9; 50mM KCl; 2.5mM MgCl₂, 10% glicerol, 1mM DTT, 0.2% Nonidet P40, 100 μ M PMSF.
- **Tampón RIPA:** 100mM Tris-HCl pH 7.5; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 0.2% Nonidet P40.

2.18 Ensayos de doble híbrido y complementación de levadura

2.18.1 Transformación de levadura

Para la complementación de las cepas *snf1y snf4*, el análisis por doble híbrido y el rastreo de la librería se siguió el mismo protocolo de transformación con algunas modificaciones, como el volumen de cultivo. Los pasos seguidos se detallan a continuación, marcándose con un astérigo los volúmenes necesarios para una transformación a pequeña escala, y con dos asteriscos el procedimiento seguido para la transformación de la librería:

1. A partir de varias colonias frescas (2-3 mm) de un cultivo en placa se realiza un inóculo de 50* o 150* ml en medio YPD-A. En el caso de transformar la librería, la cepa inicial ha sido transformada con ZmSnRK1b:BD y se encuentra, por tanto, en medio SD-Trp
2. Se incuba a 30°C y en agitación a 250 rpm y o/n, hasta que el cultivo llegue a la fase estacionaria (DO>1.5)
3. Se diluye el cultivo a un volumen final de 300ml* o 1L* de medio YPD-A, y se incuba a 30°C y agitación constante hasta alcanzar una DO~0.5 (3.5-5h)
4. Se centrifuga a 2000 rpm durante 5'
5. Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet con H₂O_{ad} estéril.
6. Se vuelve a centrifugar y descartar el sobrenadante.
7. Se resuspenden las células en 1.5 ml* o 8 ml* de 1XTE/LiAc. Estas son ya las células competentes.
8. En un tubo, se añade la mezcla: 0.1mg* o 20mg* de DNA carrier (10mg/ml de DNA de esperma de salmón sonicado y previamente hervido para desnaturalizar) y el DNA plasmídico (para DNA plasmídico: 0.1 μ g de cada uno; para DNA de la librería 0.2-0.5mg)
9. Se añaden 100 μ l* o 8ml* de células de levadura competentes.
10. Se añaden 600 μ l* o 60 ml* de PEG/AcLi.
11. Mezclar con vórtex e incubar a 30 °C y 200 rpm durante 30-45'.
12. Añadir 70 μ l* o 7ml* de DMSO, mezclando bien por inversión.
13. Incubar a 42°C durante 15'
14. Incubar en hielo durante 5-10'
15. Centrifugar las células a 2000 rpm 5'

16. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 0.5ml* o 10 ml* de TE1x.
17. Plaquear en placas de medio selectivo adecuadas para la selección de la transformación.

- **Solución 1XTE/LiAc:** 1ml 10XTE, 1ml 10XLiAc y 8 ml de H₂O_{dd} estéril
- **Solución PEG/LiAc:** 1ml 10XTE, 1ml 10XLiAc y 8ml PEG 40%, 3350.
- **40% PEG 3350:** 40 mg Polietilenglicol 3.350 en 100ml de H₂O_{dd}. Esterilizar por filtración
- **10XTE:** 0.1M Tris-HCl, 10mM EDTA, pH 7.5. Autoclavar.
- **10X LiAc:** 1M acetato de litio, pH a 7.5. Autoclavar.

2.18.2 Ensayo β -galactosidasa en filtro

Tras el rastreo de la librería, aquellos clones que crecieron en medio SD-HLTA se confirmaron mediante este tipo de ensayo:

1. Sobre una placa de medio selectivo para los dos plásmidos (-LT), colocar un filtro estéril y repicar encima las colonias obtenidas. Incubar 30°C, durante 2-3 días.
2. Con la ayuda de unas pinzas, retirar el filtro y congelar en nitrógeno líquido durante aproximadamente 10''.
3. Dejar descongelar a temperatura ambiente durante 10'' y repetir los pasos 2 y 3, tres veces más para romper totalmente las células.
4. Colocar en una placa de petri, una serie de papeles de la medida del filtro y añadir 2.5 ml de tampón Z/X-Gal .
5. Incubar a 30°C de 30' a 8h, según la fuerza de interacción.

- **Tampón Z:** 16.6 g/l Na₂HPO₄. 7H₂O, 5.5 g/l NaH₂PO₄. H₂O, 0.75g/l KCl, 0.246g/l MgSO₄.7H₂O
- **Tampón Z/Xgal:** 100ml Tampón Z, 0.27ml β -mercaptoetanol, 1.67 ml sol X-GAL
- **Solución X-Gal:** Disolver 20 mg de X-Gal en 1ml de N,N-dimetilformamida (DMF). Guardar a -20°C.

2.18.3 Extracción de DNA plasmídico de levadura

Para la extracción de DNA plasmídico de *S. cerevisiae* se utilizó el kit *Yeastmaker™ Yeast Plasmid Isolation Kit* de la casa comercial CLONTECH, que usa el método de disrupción basado en la liticasa.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. El dominio KIS de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ purificado tiene tendencia a formar dímeros más estables que la forma monomérica. La interacción entre dominios KIS-KIS es específica.
2. El transcrito y la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ se acumulan en raíces de plántulas de maíz, en condiciones de estrés osmótico. La proteína ZmAKIN $\beta\gamma$ presenta una ligera inducción ante tratamiento con la hormona ABA.
3. ZmAKIN $\beta\gamma$ está asociada a actividad SnRK1, *in vivo*. Sin embargo, el aumento de expresión de ZmAKIN $\beta\gamma$ no correlaciona con un aumento en la actividad SnRK1 inmunoprecipitada. *In vitro*, ZmAKIN $\beta\gamma$ modula positivamente una proteína de la subfamilia SnRK2.
4. Se han identificado y clonado diferentes subunidades del complejo SnRK1 de maíz: 2 subunidades catalíticas (ZmSnRK1a), 1 subunidad del tipo β (Zm β 1) y dos subunidades γ (Zm γ 1 y Zm γ 2).
5. Las subunidades catalíticas ZmSnRK1 identificadas, se expresan en semilla y plántulas de maíz, y su expresión en hoja no se regula por cambios de luz/oscuridad. El transcrito de la subunidad Zm β 1 incrementa cuando las plántulas se someten a períodos cortos de oscuridad, independientemente de la presencia de azúcar en el medio.
6. Las subunidades catalíticas ZmSnRK1a y ZmSnRK1b complementan a los mutantes *snf1* y *snf4*, indicando así su conservación funcional con la proteína SNF1. El dominio quinasa de la subunidad ZmSNRK1b presenta *per se* actividad quinasa *in vitro*. Ninguna de las subunidades Zm γ complementa al mutante *snf4*, lo que sugiere la divergencia funcional de este grupo de subunidades reguladoras de plantas, frente al ortólogo SNF4 de levadura.
7. La proteína ZmSnRK1b se localiza, en células del epitelio de cebolla, en gránulos citoplasmáticos y nucleares. La proteína ZmSnRK1a presenta una localización similar pero restringida únicamente a citoplasma
8. Mediante doble híbrido en levadura se han identificado diferentes proteínas capaces de interactuar con ZmSnRK1b, que se han clasificado en diferentes grupos funcionales. Una de las proteínas identificadas, y con interacción

específica para la subunidad ZmSnRK1b, es la MnSOD. La interacción entre ambas proteínas tiene lugar a través del dominio regulador de la quinasa.

9. La sobreexpresión de ZmSnRK1b provoca la acidificación de la proteína MnSOD cuando ambas proteínas son cotransformadas en protoplastos de *A.thaliana*, sugiriendo un cambio en la modificación postraducciona de MnSOD, provocado por ZmSnRK1b.

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alderson, A., Sabelli, P.A., Dickinson, J.R., Cole, D., Richardson, M., Kreis, M., Shewry, P.R. and Halford, N.G.** (1991) Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8602-8605.
- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J. and Leon, P.** (2000) Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev*, **14**, 2085-2096.
- Asano, K., Kinzy, T.G., Merrick, W.C. and Hershey, J.W.** (1997) Conservation and diversity of eukaryotic translation initiation factor eIF3. *J Biol Chem*, **272**, 1101-1109.
- Ashrafi, K., Lin, S.S., Manchester, J.K. and Gordon, J.I.** (2000) Sip2p and its partner *snf1p* kinase affect aging in *S. cerevisiae*. *Genes Dev*, **14**, 1872-1885.
- Axelos, M., Curie, C., Mazzolini, L., Bardet, C. and Lescure, B.** (1992) A protocol for transient gene expresión in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiol. Biochem.* **30**, 123-128
- Bateman, A.** (1997) The structure of a domain common to archaeobacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends Biochem Sci*, **22**, 12-13.
- Bhalerao, R.P., Salchert, K., Bako, L., Okresz, L., Szabados, L., Muranaka, T., Machida, Y., Schell, J. and Koncz, C.** (1999) Regulatory interaction of PRL1 WD protein with Arabidopsis SNF1-like protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5322-5327.
- Blasing, O.E., Gibon, Y., Gunther, M., Hohne, M., Morcuende, R., Osuna, D., Thimm, O., Usadel, B., Scheible, W.R. and Stitt, M.** (2005) Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, **17**, 3257-3281.
- Borisjuk L, Walenta S, Weber H, Mueller-Klieser W, Wobus U.** (1998). High-resolution histographical mapping of glucose concentrations in developing cotyledons of *Vicia faba* in relation to mitotic activity and storage processes: glucose as a possible developmental trigger. *Plant J.* **15**:583-91
- Borisjuk, L., Walenta, S., Rolletschek, H., Mueller-Klieser, W., Wobus, U. and Weber, H.** (2002) Spatial analysis of plant metabolism: sucrose imaging within *Vicia faba* cotyledons reveals specific developmental patterns. *Plant J*, **29**, 521-530.
- Bouly, J.P., Gissot, L., Lessard, P., Kreis, M. and Thomas, M.** (1999) Arabidopsis thaliana proteins related to the yeast SIP and SNF4 interact with AKINalpha1, an SNF1-like protein kinase. *Plant J*, **18**, 541-550.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Annal Biochem.* **72**:248-254
- Bradford, K.J., Downie, A.B., Gee, O.H., Alvarado, V., Yang, H. and Dahal, P.** (2003) Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. *Plant Physiol*, **132**, 1560-1576.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Browne, G. J., S. G. Finn, et al.** (2004). "Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398." *J Biol Chem* **279**(13): 12220-31.

Buitink, J., Thomas, M., Gissot, L. and Leprince, O. (2003) Starvation, osmotic stress and desiccation tolerance lead to expression of different genes of the regulatory b and c subunits of the SnRK1 complex in germinating seeds of *Medicago truncatula*. *Plant Cell Environ.* **27**, 55–67.

Bykova, N.V., Egsgaard, H. and Moller, I.M. (2003) Identification of 14 new phosphoproteins involved in important plant mitochondrial processes. *FEBS Lett*, **540**, 141-146.

Celenza JL, Carlson M. (1986) A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*, **233**, 1175-80.

Celenza, J.L. and Carlson, M. (1989) Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol Cell Biol*, **9**, 5034-5044.

Chen, R., Fearnley, I.M., Peak-Chew, S.Y. and Walker, J.E. (2004) The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem*, **279**, 26036-26045.

Chiou, T.J. and Bush, D.R. (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4784-4788.

Contento, A.L., Kim, S.J. and Bassham, D.C. (2004) Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to Suc starvation. *Plant Physiol*, **135**, 2330-2347.

Cullen, P.J. and Sprague, G.F., Jr. (2000) Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13619-13624.

Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., Levine, A. and Granot, D. (1999) Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell*, **11**, 1253-1266.

Dale, S., Arro, M., Becerra, B., Morrice, N.G., Boronat, A., Hardie, D.G. and Ferrer, A. (1995) Bacterial expression of the catalytic domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (isoform HMGR1) from *Arabidopsis thaliana*, and its inactivation by phosphorylation at Ser577 by Brassica oleracea 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase. *Eur J Biochem*, **233**, 506-513.

Damoc, E., Fraser, C.S., Zhou, M., Videler, H., Mayeur, G.L., Hershey, J.W., Doudna, J.A., Robinson, C.V. and Leary, J.A. (2007) Structural characterization of the human eukaryotic initiation factor 3 protein complex by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*.

Davies SP, Hawley SA, Woods A, Carling D, Haystead TA, Hardie DG. (1994). Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur J Biochem*. **223**, 351-7

Davies, J.K., Wells, D.J., Liu, K., Whitrow, H.R., Daniel, T.D., Grignani, R., Lygate, C.A., Schneider, J.E., Noel, G., Watkins, H. and Carling, D. (2006) Characterization of the role of gamma2 R531G mutation in AMP-activated protein kinase in cardiac hypertrophy and Wolff-Parkinson-White syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **290**, H1942-1951.

Day, P., Sharff, A., Parra, L., Cleasby, A., Williams, M., Horer, S., Nar, H., Redemann, N., Tickle, I. and Yon, J. (2007) Structure of a CBS-domain pair from the regulatory gamma1 subunit of human AMPK in complex with AMP and ZMP. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **63**, 587-596.

Dekkers, B.J., Schuurmans, J.A. and Smeekens, S.C. (2004) Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **218**, 579-588.

del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Altomare, D.A. and Zilinskas, B.A. (2003) Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *J Exp Bot*, **54**, 923-933.

- DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, P.O.** (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278**, 680-686.
- DeVit, M.J. and Johnston, M.** (1999) The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol*, **9**, 1231-1241.
- Dodd, A.N., Salathia, N., Hall, A., Kevei, E., Toth, R., Nagy, F., Hibberd, J.M., Millar, A.J. and Webb, A.A.** (2005) Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science*, **309**, 630-633.
- Douglas, P., Pigaglio, E., Ferrer, A., Halfords, N.G. and MacKintosh, C.** (1997) Three spinach leaf nitrate reductase-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinases that are required by reversible phosphorylation and/or Ca²⁺ ions. *Biochem J*, **325** (Pt 1), 101-109.
- Drincovich, M.F., Casati, P. and Andreo, C.S.** (2001) NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Lett*, **490**, 1-6.
- Elbing, K., Rubenstein, E.M., McCartney, R.R. and Schmidt, M.C.** (2006) Subunits of the Snf1 kinase heterotrimer show interdependence for association and activity. *J Biol Chem*, **281**, 26170-26180.
- Estruch, F., Treitel, M.A., Yang, X. and Carlson, M.** (1992) N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function. *Genetics*, **132**, 639-650.
- Farkas, I., Dombradi, V., Miskei, M., Szabados, L. and Koncz, C.** (2007) Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci*, **12**, 169-176.
- Farras, R., Ferrando, A., Jasik, J., Kleinow, T., Okresz, L., Tiburcio, A., Salchert, K., del Pozo, C., Schell, J. and Koncz, C.** (2001) SKP1-SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *Embo J*, **20**, 2742-2756.
- Ferrando, A., Farras, R., Jasik, J., Schell, J. and Koncz, C.** (2000) Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in *Agrobacterium*-transformed plant cells. *Plant J*, **22**, 553-560.
- Ferrando, A., Koncz-Kalman, Z., Farras, R., Tiburcio, A., Schell, J. and Koncz, C.** (2001) Detection of in vivo protein interactions between Snf1-related kinase subunits with intron-tagged epitope-labelling in plants cells. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3685-3693.
- Finkelstein, R.R. and Lynch, T.J.** (2000) Abscisic acid inhibition of radicle emergence but not seedling growth is suppressed by sugars. *Plant Physiol*, **122**, 1179-1186.
- Fordham-Skelton, A.P., Chilly, P., Lumberras, V., Reignoux, S., Fenton, T.R., Dahm, C.C., Pages, M. and Gatehouse, J.A.** (2002) A novel higher plant protein tyrosine phosphatase interacts with SNF1-related protein kinases via a KIS (kinase interaction sequence) domain. *Plant J*, **29**, 705-715.
- Garciarrubio, A., Legaria, J.P. and Covarrubias, A.A.** (1997) Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta*, **203**, 182-187.
- Giege, P., Heazlewood, J.L., Roessner-Tunali, U., Millar, A.H., Fernie, A.R., Leaver, C.J. and Sweetlove, L.J.** (2003) Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell*, **15**, 2140-2151.
- Gimeno-Alcaniz, J.V. and Sanz, P.** (2003) Glucose and type 2A protein phosphatase regulate the interaction between catalytic and regulatory subunits of AMP-activated protein kinase. *J Mol Biol*, **333**, 201-209.
- Gissot, L., Polge, C., Bouly, J.P., Lemaitre, T., Kreis, M. and Thomas, M.** (2004) AKINbeta3, a plant specific SnRK1 protein, is lacking domains present in yeast and mammals non-catalytic beta-subunits. *Plant Mol Biol*, **56**, 747-759.

- Gissot, L., Polge, C., Jossier, M., Girin, T., Bouly, J.P., Kreis, M. and Thomas, M.** (2006) AKINbetagamma contributes to SnRK1 heterotrimeric complexes and interacts with two proteins implicated in plant pathogen resistance through its KIS/GBD sequence. *Plant Physiol*, **142**, 931-944.
- Goday, A., Jensen, A.B., Culianez-Macia, F.A., Mar Alba, M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M. and Pages, M.** (1994) The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell*, **6**, 351-360.
- Gupta, A.K. and Kaur, N.** (2005) Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J Biosci*, **30**, 761-776.
- Halford NG, Hardie DG.** (1998) SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol*. Jul;37:735-48.
- Halford NG, Hey S, Jhurreea D, Laurie S, McKibbin RS, Paul M, Zhang.** (2003). Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase. *J Exp Bot*. **54**, 467-75
- Halford, N.G. and Paul, M.J.** (2003) Carbon metabolite sensing and signalling. *Plant Biotechnol J*, **1**, 381-398.
- Halford, N.G., Hey, S., Jhurreea, D., Laurie, S., McKibbin, R.S., Zhang, Y. and Paul, M.J.** (2004) Highly conserved protein kinases involved in the regulation of carbon and amino acid metabolism. *J Exp Bot*, **55**, 35-42.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T.** (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52.
- Hannappel, U., Vicente-Carbajosa, J., Barker, J.H., Shewry, P.R. and Halford, N.G.** (1995) Differential expression of two barley SNF1-related protein kinase genes. *Plant Mol Biol*, **27**, 1235-1240.
- Hao, L., Wang, H., Sunter, G. and Bisaro, D.M.** (2003) Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell*, **15**, 1034-1048.
- Hardie DG, Hawley SA, Scott JW.** (2006) AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept *J.Phys* 2006 Jul 1;5747-15.
- Hardie DG, Sakamoto K.** (2006) AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda)*. **21**, 48-60
- Hardie, D.G.** (2004) The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci*, **117**, 5479-5487.
- Hardie, D.G. and Carling, D.** (1997) The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem*, **246**, 259-273.
- Hardie, D.G., Carling, D. and Carlson, M.** (1998) The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem*, **67**, 821-855.
- Hardie, D.G., Scott, J.W., Pan, D.A. and Hudson, E.R.** (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett*, **546**, 113-120.
- Hare P D, Cress W A and van Staden J** (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress; *Plant Cell Environ*. **21** 535-554
- Hedbacker, K. and Carlson, M.** (2006) Regulation of the nucleocytoplasmic distribution of Snf1-Gal83 protein kinase. *Eukaryot Cell*, **5**, 1950-1956.

- Hedbacker, K., Townley, R. and Carlson, M.** (2004) Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates the subcellular localization of Snf1-Sip1 protein kinase. *Mol Cell Biol*, **24**, 1836-1843.
- Hey, S., Mayerhofer, H., Halford, N.G. and Dickinson, J.R.** (2007) DNA sequences from Arabidopsis, which encode protein kinases and function as upstream regulators of snf1 in yeast. *J Biol Chem*, **282**, 10472-10479.
- Hindupur K. Anandatheerthavarada, Gopa Biswas, Jayati Mullick, Naresh Babu V. Sepuri, Laszlo Otvos, Debkumar Pain and Narayan G. Avadhani** (1999) Dual targeting of cytochrome P4502B1 to endoplasmic reticulum and mitochondria involves a novel signal activation by cyclic AMP-dependent phosphorylation at Ser128 *The EMBO Journal* **18**, 5494-5504
- Hofmann, K. and Bucher, P.** (1996) The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem Sci*, **21**, 172-173.
- Hong, S.P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D. and Carlson, M.** (2003) Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8839-8843.
- Hong, S.P., Momcilovic, M. and Carlson, M.** (2005) Function of mammalian LKB1 and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha as Snf1-activating kinases in yeast. *J Biol Chem*, **280**, 21804-21809.
- Hong-Brown, L.Q., Brown, C.R., Huber, D.S. and Lang, C.H.** (2007) Alcohol regulates eukaryotic elongation factor 2 phosphorylation via an AMP-activated protein kinase-dependent mechanism in C2C12 skeletal myocytes. *J Biol Chem*, **282**, 3702-3712.
- Honigberg, S.M. and Lee, R.H.** (1998) Snf1 kinase connects nutritional pathways controlling meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **18**, 4548-4555.
- Hopper, R.K., Carroll, S., Aponte, A.M., Johnson, D.T., French, S., Shen, R.F., Witzmann, F.A., Harris, R.A. and Balaban, R.S.** (2006) Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry*, **45**, 2524-2536.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.K. and Harmon, A.C.** (2003) The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol*, **132**, 666-680
- Huber, S.C. and Huber, J.L.** (1990) Activation of sucrose-phosphate synthase from darkened spinach leaves by an endogenous protein phosphatase. *Arch Biochem Biophys*, **282**, 421-426.
- Hudson, E.R., Pan, D.A., James, J., Lucocq, J.M., Hawley, S.A., Green, K.A., Baba, O., Terashima, T. and Hardie, D.G.** (2003) A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Curr Biol*, **13**, 861-866.
- Hurley, R.L., Barre, L.K., Wood, S.D., Anderson, K.A., Kemp, B.E., Means, A.R. and Witters, L.A.** (2006) Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J Biol Chem*, **281**, 36662-36672.
- Iseli, T.J., Walter, M., van Denderen, B.J., Katsis, F., Witters, L.A., Kemp, B.E., Mitchell, B.J. and Stapleton, D.** (2005) AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270). *J Biol Chem*, **280**, 13395-13400.
- Jaleel, M., F. Villa, et al.** (2006). "The ubiquitin-associated domain of AMPK-related kinases regulates conformation and LKB1-mediated phosphorylation and activation." *Biochem J* **394**: 545-55.
- Jiang R, Carlson M.** (1996) Glucose regulates protein interactions within the yeasts SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* **10**, 3105-1

Jiang R, Carlson M. (1997). The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol.* **17**, 2099-106.

Johnson LN, Noble ME, Owen DJ (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**: 149–158

Johnston M, Kim JH. (2005) Glucose as a hormone: receptor-mediated glucose sensing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Soc Trans.* **33**, 247-52

Jonsdottir, G., Bjarnason, J.B. and Gudmundsdottir, A. (2004) Recombinant cold-adapted trypsin I from Atlantic cod-expression, purification, and identification. *Protein Expr Purif.* **33**, 110-122.

Kanegae, H., Miyoshi, K., Hirose, T., Tsuchimoto, S., Mori, M., Nagato, Y. and Takano, M. (2005) Expressions of rice sucrose non-fermenting-1 related protein kinase 1 genes are differently regulated during the carypopsis development. *Plant Physiol Biochem.* **43**, 669-679.

Kaur S, Gupta A K and Kaur N (2000) Effect of GA₃, kinetin and indole acetic acid on carbohydrate metabolism in chickpea seedlings germinating under water stress; *Plant Growth Regul.* **30** 61–70

Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E. and Anderson, P. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol.* **169**, 871-884.

Kemp, B.E. (2004) Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *J Clin Invest.* **113**, 182-184.

Kerk, D., Conley, T.R., Rodriguez, F.A., Tran, H.T., Nimick, M., Muench, D.G. and Moorhead, G.B. (2006) A chloroplast-localized dual-specificity protein phosphatase in *Arabidopsis* contains a phylogenetically dispersed and ancient carbohydrate-binding domain, which binds the polysaccharide starch. *Plant J.* **46**, 400-413.

Kleinow, T., Bhalerao, R., Breuer, F., Umeda, M., Salchert, K. and Konec, C. (2000) Functional identification of an *Arabidopsis* snf4 ortholog by screening for heterologous multicopy suppressors of snf4 deficiency in yeast. *Plant J.* **23**, 115-122.

Koch, K.E. (1996) Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **47**, 509-540.

Kuchin S, Treich I, Carlson M. (2000) A regulatory shortcut between the Snf1 protein kinase and RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 7916-20.

Kukidome, D., Nishikawa, T., Sonoda, K., Imoto, K., Fujisawa, K., Yano, M., Motoshima, H., Taguchi, T., Matsumura, T. and Araki, E. (2006) Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes.* **55**, 120-127.

Lakatos, L., Klein, M., Hofgen, R. and Banfalvi, Z. (1999) Potato StubSNF1 interacts with StubGAL83: a plant protein kinase complex with yeast and mammalian counterparts. *Plant J.* **17**, 569-574.

Laurie, S., McKibbin, R.S. and Halford, N.G. (2003) Antisense SNF1-related (SnRK1) protein kinase gene represses transient activity of an alpha-amylase (alpha-Amy2) gene promoter in cultured wheat embryos. *J Exp Bot.* **54**, 739-747.

Le Guen, L., Thomas, M., Bianchi, M., Halford, N.G. and Kreis, M. (1992) Structure and expression of a gene from *Arabidopsis thaliana* encoding a protein related to SNF1 protein kinase. *Gene.* **120**, 249-254.

- Lederberg EM and Cohen SN (1974)** Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of bacteriology*.119(3):1072-1074
- Leon, P. and J. Sheen (2003)**. "Sugar and hormone connections." *Trends Plant Sci.* **8**(3): 110-6.
- Lo WS, Duggan L, Emre NC, Belotserkovskya R, Lane WS, Shiekhattar R, Berger SL. (2001)** Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gen5 to regulate transcription. *Science.* **293**, 1142-6
- Lo, W.S., Gamache, E.R., Henry, K.W., Yang, D., Pillus, L. and Berger, S.L. (2005)** Histone H3 phosphorylation can promote TBP recruitment through distinct promoter-specific mechanisms. *Embo J*, **24**, 997-1008.
- López-Pérez J, del Olmo Fernández E, San Feliciano A. (2005)** Interacciones fármaco-Diana. Bases para el diseño de nuevos fármaco. *Enf. Emerg* 7(21): 52-56
- Lovas, A., Bimbo, A., Szabo, L. and Banfalvi, Z. (2003)** Antisense repression of *StubGAL83* affects root and tuber development in potato. *Plant J*, **33**, 139-147.
- Lovas, A., Sos-Hegedus, A., Bimbo, A. and Banfalvi, Z. (2003)** Functional diversity of potato SNF1-related kinases tested in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **321**, 123-129
- Lumbreras, V., Alba, M.M., Kleinow, T., Koncz, C. and Pages, M. (2001)** Domain fusion between SNF1-related kinase subunits during plant evolution. *EMBO Rep*, **2**, 55-60.
- MacKintosh, C. (1992)** Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, **1137**, 121-126.
- McKibbin, R.S., Muttucumaru, N., Paul, M.J., Powers, S.J., Burrell, M.M., Coates, S., Purcell, P.C., Tiessen, A., Geigenberger, P. and Halford, N.G. (2006)** Production of high-starch, low-glucose potatoes through over-expression of the metabolic regulator SnRK1. *Plant Biotechnol J*, **4**, 409-418.
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fougelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M.J., Stuck, B.J. and Kahn, B.B. (2004)** AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, **428**, 569-574.
- Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Fryer, L.G., Muller, C., Carling, D. and Kahn, B.B. (2002)** Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, **415**, 339-343.
- Mitchelhill, K.I., Stapleton, D., Gao, G., House, C., Michell, B., Katsis, F., Witters, L.A. and Kemp, B.E. (1994)** Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *J Biol Chem*, **269**, 2361-2364.
- Momcilovic, M., Hong, S.P. and Carlson, M. (2006)** Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem*, **281**, 25336-25343.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.H., Liu, Y.X., Hwang, I., Jones, T. and Sheen, J. (2003)** Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, **300**, 332-336.
- Moreno F, Ahuatzí D, Riera A, Palomino CA, Herrero P. (2005)** Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. *Biochem Soc Trans.* **33**, 265-8
- Mueller, T.D. and Feigon, J. (2002)** Solution structures of UBA domains reveal a conserved hydrophobic surface for protein-protein interactions. *J Mol Biol*, **319**, 1243-1255.

Muranaka, T., Banno, H. and Machida, Y. (1994) Characterization of tobacco protein kinase NPK5, a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 that constitutively activates expression of the glucose-repressible SUC2 gene for a secreted invertase of *S. cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **14**, 2958-2965.

Nakano, M., Hamada, T., Hayashi, T., Yonemitsu, S., Miyamoto, L., Toyoda, T., Tanaka, S., Masuzaki, H., Ebihara, K., Ogawa, Y., Hosoda, K., Inoue, G., Yoshimasa, Y., Otaka, A., Fushiki, T. and Nakao, K. (2006) alpha2 Isoform-specific activation of 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-d-ribose nucleoside at a physiological level activates glucose transport and increases glucose transporter 4 in mouse skeletal muscle. *Metabolism*, **55**, 300-308.

Nayak, V., Zhao, K., Wyce, A., Schwartz, M.F., Lo, W.S., Berger, S.L. and Marmorstein, R. (2006) Structure and dimerization of the kinase domain from yeast Snf1, a member of the Snf1/AMPK protein family. *Structure*, **14**, 477-485.

Ohnishi, T., Yamashita, A., Kashima, I., Schell, T., Anders, K.R., Grimson, A., Hachiya, T., Hentze, M.W., Anderson, P. and Ohno, S. (2003) Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol Cell*, **12**, 1187-1200.

Ohto, M.A., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., Nakamura, K. and Harada, J.J. (2005) Control of seed mass by APETALA2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3123-3128.

Olsson, T., Thelander, M. and Ronne, H. (2003) A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. *J Biol Chem*, **278**, 44439-44447.

Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* **12**: 357-358

Pang T, Xiong B, Li JY, Qiu BY, Jin GZ, Shen JK, Li J. (2007) Conserved alpha-helix acts as autoinhibitory sequence in AMP-activated protein kinase alpha subunits. *J Biol Chem*. ;282:495-506.

Perfus-Barbeoch, L., Jones, A.M. and Assmann, S.M. (2004) Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 719-731.

Pien, S., Wyrzykowska, J. and Fleming, A.J. (2001) Novel marker genes for early leaf development indicate spatial regulation of carbohydrate metabolism within the apical meristem. *Plant J*, **25**, 663-674.

Polekhina, G., Gupta, A., Michell, B.J., van Denderen, B., Murthy, S., Feil, S.C., Jennings, I.G., Campbell, D.J., Witters, L.A., Parker, M.W., Kemp, B.E. and Stapleton, D. (2003) AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Curr Biol*, **13**, 867-871.

Polekhina, G., Gupta, A., van Denderen, B.J., Feil, S.C., Kemp, B.E., Stapleton, D. and Parker, M.W. (2005) Structural basis for glycogen recognition by AMP-activated protein kinase. *Structure*, **13**, 1453-1462.

Polge, C. and Thomas, M. (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci*, **12**, 20-28.

Purcell, P.C., Smith, A.N., Halford, N.G. (1998) Antisense expression of a sucrose non-fermenting-1-related protein kinase sequence in potato results in decreased expression of sucrose synthase in tubers and loss of sucrose-inducibility of sucrose synthase transcripts in leaves. *Plant J*. **14**, 195-202.

Quirino, B.F., Noh, Y.S., Himelblau, E. and Amasino, R.M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci*, **5**, 278-282.

Radchuk, R., Radchuk, V., Weschke, W., Borisjuk, L. and Weber, H. (2006) Repressing the expression of the SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED PROTEIN KINASE gene in pea

embryo causes pleiotropic defects of maturation similar to an abscisic acid-insensitive phenotype. *Plant Physiol*, **140**, 263-278.

Reznick, R.M. and Shulman, G.I. (2006) The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. *J Physiol*, **574**, 33-39.

Roitsch, T. (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 198-206.

Roitsch, T. and M. C. Gonzalez (2004). "Function and regulation of plant invertases: sweet sensations." *Trends Plant Sci.* **9**(12): 606-13.

Roldan, M., Gomez-Mena, C., Ruiz-Garcia, L., Salinas, J. and Martinez-Zapater, J.M. (1999) Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of Arabidopsis in the dark. *Plant J*, **20**, 581-590.

Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J.(2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol.* **57**, 675-709

Rolland F, Moore B, Sheen J. (2002 b) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell.* **14**, 185-205

Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM. (2002 a) Glucose-sensing and signalling mechanisms in yeast. *Fems Yeast Res.* **2**, 183-201

Rook, F. and Bevan, M.W. (2003) Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. *J Exp Bot*, **54**, 495-501.

Rook, F., Gerrits, N., Kortstee, A., van Kampen, M., Borrias, M., Weisbeek, P. and Smeekens, S. (1998) Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene. *Plant J*, **15**, 253-263.

Rudolph MJ, Amodeo GA, Iram SH, Hong SP, Pirino G, Carlson M, Tong L. (2007) Structure of the Bateman2 domain of yeast Snf4: dimeric association and relevance for AMP binding. *Structure* **15**:65-74

Rudolph, M.J., Amodeo, G.A., Bai, Y. and Tong, L. (2005) Crystal structure of the protein kinase domain of yeast AMP-activated protein kinase Snf1. *Biochem Biophys Res Commun*, **337**, 1224-1228.

Rutter, G.A., Da Silva Xavier, G. and Leclerc, I. (2003) Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J*, **375**, 1-16.

Sakoda, H., Fujishiro, M., Fujio, J., Shojima, N., Ogihara, T., Kushiyama, A., Fukushima, Y., Anai, M., Ono, H., Kikuchi, M., Horike, N., Viana, A.Y., Uchijima, Y., Kurihara, H. and Asano, T. (2005) Glycogen debranching enzyme association with beta-subunit regulates AMP-activated protein kinase activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **289**, E474-481.

Salt, I., Celler, J.W., Hawley, S.A., Prescott, A., Woods, A., Carling, D. and Hardie, D.G. (1998) AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem J*, **334** (Pt 1), 177-187.

Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M.A. and Carling, D. (2007) Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J*, **403**, 139-148.

Scandalios, J.G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, **38**, 995-1014.

Scheer, U. and Hock, R. (1999) Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 385-390.

Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbes, B., Paul, M. and Smeekens, S. (2004) Trehalose mediated growth inhibition of Arabidopsis seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol*, **135**, 879-890.

Schmidt MC, McCartney RR (2000) Beta-subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *Embo J*, **19**, 4936-43.

Schuller HJ. (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **43**, 139-60.

Schuller, H.J. and Entian, K.D. (1988) Molecular characterization of yeast regulatory gene CAT3 necessary for glucose derepression and nuclear localization of its product. *Gene*, **67**, 247-257.

Schwachtje, J., Minchin, P.E., Jahnke, S., van Dongen, J.T., Schittko, U. and Baldwin, I.T. (2006) SNF1-related kinases allow plants to tolerate herbivory by allocating carbon to roots. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12935-12940.

Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, K.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A., Norman, D.G. and Hardie, D.G. (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *J Clin Invest*, **113**, 274-284.

Scott, J.W., Ross, F.A., Liu, J.K. and Hardie, D.G. (2007) Regulation of AMP-activated protein kinase by a pseudosubstrate sequence on the gamma subunit. *Embo J*, **26**, 806-815.

Sheen, J. (1990) Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell*, **2**, 1027-1038

Sheen, J., Zhou, L. and Jang, J.C. (1999) Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 410-418.

Shen, W. and Hanley-Bowdoin, L. (2006) Geminivirus infection up-regulates the expression of two Arabidopsis protein kinases related to yeast SNF1- and mammalian AMPK-activating kinases. *Plant Physiol*, **142**, 1642-1655.

Sherson, S.M., Alford, H.L., Forbes, S.M., Wallace, G. and Smith, S.M. (2003) Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of Arabidopsis. *J Exp Bot*, **54**, 525-531.

Slocombe, S.P., Laurie, S., Bertini, L., Beaudoin, F., Dickinson, J.R. and Halford, N.G. (2002) Identification of SnIP1, a novel protein that interacts with SNF1-related protein kinase (SnRK1). *Plant Mol Biol*, **49**, 31-44.

Smeekens, S. (2000) Sugar-Induced Signal Transduction in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **51**, 49-81.

Smith, F. C., S. P. Davies, et al. (1999). "The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p in vitro at four sites within or near regulatory domain 1." *FEBS Lett* **453**(1-2): 219-23.

Stapleton, D., Mitchelhill, K.I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B.J., Teh, T., House, C.M., Fernandez, C.S., Cox, T., Witters, L.A. and Kemp, B.E. (1996) Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem*, **271**, 611-614.

Stojanovski, D., Johnston, A.J., Streimann, I., Hoogenraad, N.J. and Ryan, M.T. (2003) Import of nuclear-encoded proteins into mitochondria. *Exp Physiol*, **88**, 57-64.

Subbaiah, C.C., Palaniappan, A., Duncan, K., Rhoads, D.M., Huber, S.C. and Sachs, M.M. (2006) Mitochondrial localization and putative signaling function of sucrose synthase in maize. *J Biol Chem*, **281**, 15625-15635.

- Sugden, C., Crawford, R.M., Halford, N.G. and Hardie, D.G.** (1999a) 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 J*, **19**, 433-439.
- Sugden, C., Donaghy, P.G., Halford, N.G. and Hardie, D.G.** (1999b) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. *Plant Physiol*, **120**, 257-274.
- Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T. and Neumann, D.** (2006) Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **281**, 32207-32216.
- Sutherland, C.M., Hawley, S.A., McCartney, R.R., Leech, A., Stark, M.J., Schmidt, M.C. and Hardie, D.G.** (2003) Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Curr Biol*, **13**, 1299-1305.
- Takano, M., Kajiya-Kanegae, H., Funatsuki, H. and Kikuchi, S.** (1998) Rice has two distinct classes of protein kinase genes related to SNF1 of *Saccharomyces cerevisiae*, which are differently regulated in early seed development. *Mol Gen Genet*, **260**, 388-394.
- Tang, G.Q., Hardin, S.C., Dewey, R. and Huber, S.C.** (2003) A novel C-terminal proteolytic processing of cytosolic pyruvate kinase, its phosphorylation and degradation by the proteasome in developing soybean seeds. *Plant J*, **34**, 77-93.
- Thelander, M., Olsson, T. and Ronne, H.** (2004) Snf1-related protein kinase 1 is needed for growth in a normal day-night light cycle. *Embo J*, **23**, 1900-1910.
- Thevelein JM, Hohmann S.** (1995) Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem Sci*. **20**, 3-10
- Thomashow, M.F.** (1999) PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **50**, 571-599.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G.** (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4876-4882.
- Tiessen, A., Prescha, K., Branscheid, A., Palacios, N., McKibbin, R., Halford, N.G. and Geigenberger, P.** (2003) Evidence that SNF1 related kinase and hexokinase are involved in separate sugarsignalling pathways modulating posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers. *Plant J.*, **35**, 490-500.
- Tomas, E., Tsao, T.S., Saha, A.K., Murrey, H.E., Zhang Cc, C., Itani, S.I., Lodish, H.F. and Ruderman, N.B.** (2002) Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16309-16313.
- Toroser, D., Plaut, Z. and Huber, S.C.** (2000) Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol*, **123**, 403-412.
- Vincent O, Townley R, Kuchin S, Carlson.** (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev*. **15**, 1104-14.
- Wanner L A and Junttila O** (1999) Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*; *Plant Physiol*. **120** 391-399
- Warden, S.M., Richardson, C., O'Donnell, J., Jr., Stapleton, D., Kemp, B.E. and Witters, L.A.** (2001) Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *Biochem J*, **354**, 275-283.

- Weise, A., Barker, L., Kuhn, C., Lalonde, S., Buschmann, H., Frommer, W.B. and Ward, J.M. (2000) A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in nucleate sieve elements of plants. *Plant Cell*, **12**, 1345-1355.
- Wilson, W.A., Hawley, S.A. and Hardie, D.G. (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol*, **6**, 1426-1434.
- Wong, K.A. and Lodish, H.F. (2006) A revised model for AMP-activated protein kinase structure: The alpha-subunit binds to both the beta- and gamma-subunits although there is no direct binding between the beta- and gamma-subunits. *J Biol Chem*, **281**, 36434-36442.
- Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D. (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol*, **13**, 2004-2008.
- Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M. and Carling, D. (1994) Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J Biol Chem*, **269**, 19509-19515.
- Woods, A., Salt, I., Scott, J., Hardie, D.G. and Carling, D. (1996) The alpha1 and alpha2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. *FEBS Lett*, **397**, 347-351.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, B.B. and Kadowaki, T. (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, **8**, 1288-1295.
- Yanagisawa, S., Yoo, S.D. and Sheen, J. (2003) Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants. *Nature*, **425**, 521-525.
- Yang, X., Hubbard, E.J. and Carlson, M. (1992) A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science*, **257**, 680-682.
- Yoine, M., Ohto, M.A., Onai, K., Mita, S. and Nakamura, K. (2006) The Iba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in Arabidopsis. *Plant J*, **47**, 49-62.
- Yoshida, E.N., Benkel, B.F., Fong, Y. and Hickey, D.A. (1999) Sequence and phylogenetic analysis of the SNF4/AMPK gamma subunit gene from *Drosophila melanogaster*. *Genome*, **42**, 1077-1087.
- Young, E.T., Dombek, K.M., Tachibana, C. and Ideker, T. (2003) Multiple pathways are co-regulated by the protein kinase Snf1 and the transcription factors Adr1 and Cat8. *J Biol Chem*, **278**, 26146-26158.
- Zhang, Y., Shewry, P.R., Jones, H., Barcelo, P., Lazzeri, P.A. and Halford, N.G. (2001) Expression of antisense SnRK1 protein kinase sequence causes abnormal pollen development and male sterility in transgenic barley. *Plant J*, **28**, 431-441.
- Zhou, L., Jang, J.C., Jones, T.L. and Sheen, J. (1998) Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10294-10299.
- Zhu, D. and Scandalios, J.G. (1993) Maize mitochondrial manganese superoxide dismutases are encoded by a differentially expressed multigene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9310-9314.
- Zou, M.H., Kirkpatrick, S.S., Davis, B.J., Nelson, J.S., Wiles, W.G.t., Schlattner, U., Neumann, D., Brownlee, M., Freeman, M.B. and Goldman, M.H. (2004) Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem*, **279**, 43940-43951.

VIII. APÉNDICES

I. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de ZmSnRK1a

ATG GAG GGA GCG GGA AGA GAT GCC AAC CCT TTG GGC GGA TAC CGA	45
M E G A G R D A N P L G G Y R	15
ATT GGC AAA ACC CTG GGA ATC GGG TCG TTC GGT AAA GTG AAG ATC	90
I G K T L G I G S F G K V K I	30
GCG GAA CAT ATA TTG ACT GGC CAT AAG GTG GCA ATC AAG ATC CTC	135
A E H I L T G H K V A I K I L	45
AAT CGC CGT AAG ATC AGA AGC ATG GAA ATG GAA GAG AAA GTG AAG	180
N R R K I R S M E M E E K V K	60
AGA GAA ATC AAG ATA CTG AGA TTA TTT ATG CAT CCT CAT ATC ATA	225
R E I K I L R L F M H P H I I	75
CGC CTT TAT GAG GTG ATA GAT ACA CCT GCT GAT ATT TAT GTT GTT	270
R L Y E V I D T P A D I Y V V	90
ATG GAG TAT GTT AAA TCT GGA GAG TTG TTT GAT TAC ATT GTT GAG	315
M E Y V K S G E L F D Y I V E	105
AAG GGA AGA CTA CAT GAA GAA GAA GCC CGG CGC TTT TTT CAG CAG	360
K G R L H E E E A R R F F Q Q	120
ATC GTA TCT GGT GTT GAA TAT TGC CAT AGG AAC ATG GTT GCT CAC	405
I V S G V E Y C H R N M V A H	135
CGT GAT TTA AAG CCA GAG AAT CTT CTT TTG GAT TCG AAA TGC AAC	450
R D L K P E N L L L D S K C N	150
ATT AAG ATT GCT GAT TTT GGC TTA AGT AAT GTT ATG CGT GAT GGT	495
I K I A D F G L S N V M R D G	165
CAC TTT CTT AAG ACG AGT TGT GGT AGC CCG AAT TAT GCA GCA CCT	540
H F L K T S C G S P N Y A A P	180
GAG GTC ATA TCT GGT AAA CTA TAT GCT GGT CCT GAA GTT GAT GTC	585
E V I S G K L Y A G P E V D V	195
TGG AGC TGC GGC GTT ATT CTT TAT GCT CTT CTT TGT GGC ACT CTT	630
W S C G V I L Y A L L C G T L	210
CCA TTT GAC GAT GAG AAT ATT CCA AAC CTT TTT AAG AAA ATA AAG	675
P F D D E N I P N L F K K I K	225
GGT GGA ATA TAT ACC CTT CCT AGT CAT TTG TCA CCT TCA GCG AGG	720
G G I Y T L P S H L S P S A R	240
GAC TTG ATT CCT AGA ATG CTG GTT GTT GAT CCG ATG AAA AGG ATT	765
D L I P R M L V V D P M K R I	255
ACA ATA CGT GAA ATC CGT GAA CAT GTG TGG TTC AAA ATT CAA CTT	810
T I R E I R E H V W F K I Q L	270
CCG CGC TAT TTA GCT GTA CCG CCT CCG GAC ACT GCA CAA CAA GTT	855
P R Y L A V P P P D T A Q Q V	285
AAG AAG CTG GAC GAG GAA ACC CTT AAT GAT GTT ATT AAG ATG GGT	900
K K L D E E T L N D V I K M G	300
TTT GAC AAG AAT CAG CTA ATT GAA TCT CTG CAC AAC AGA TTG CAG	945
F D K N Q L I E S L H N R L Q	315
AAT GAG GCA ACA GTT GCC TAT TAT TTA CTC ATG GAC AaT AGG CTT	990
N E A T V A Y Y L L M D N R L	330
CGT ACA ACC AGT GGT TAT CTT GGA TCT GAG TTT CAA GAa TCT ATG	1035
R T T S G Y L G S E F Q E S M	345

GAC	CCA	TCT	TTC	TCT	CAA	GTA	CAT	GCT	GGA	ACA	CCA	ACT	TCA	GCA	1080
D	P	S	F	S	Q	V	H	A	G	T	P	T	S	A	360
ACT	GAA	CAT	CGA	CAG	CAT	GTG	TCT	ACA	GAA	TCT	CCG	GGG	TCT	GGT	1125
T	E	H	R	Q	H	V	S	T	E	S	P	G	S	G	375
TTG	AGG	CAG	CAT	TTT	GCA	TCT	GAA	AGG	AAA	TGG	GCC	CTT	GGT	CTT	1170
L	R	Q	H	F	A	S	E	R	K	W	A	L	G	L	390
CAG	TCT	CGA	GCA	CAT	CCA	CGA	GAA	ATA	ATA	AGT	GAA	GTG	CTT	AAA	1215
Q	S	R	A	H	P	R	E	I	I	S	E	V	L	K	405
GCA	CTG	CAA	GAA	CTG	AAT	GTT	TAC	TGG	AAA	AAG	ATT	GGA	CAC	TAC	1260
A	L	Q	E	L	N	V	Y	W	K	K	I	G	H	Y	420
AAC	ATG	AAA	TGC	AGA	TGG	AGT	CCT	GGC	TGC	CTT	GAG	AGT	ATG	ATG	1305
N	M	K	C	R	W	S	P	G	C	L	E	S	M	M	435
CAT	AAC	TGT	GAT	GGC	TTT	AGT	GCA	GAG	TCT	GCT	ATA	ATT	GAA	ACT	1350
H	N	C	D	G	F	S	A	E	S	A	I	I	E	T	450
GAT	GAT	CTC	ATA	GCG	AAA	TCA	ACC	CGT	ATA	GTG	AAG	TTT	GAG	ATT	1395
D	D	L	I	A	K	S	T	R	I	V	K	F	E	I	465
CAG	CTT	TAC	AAA	ACG	AGG	GAT	GAG	AAG	TAC	CTT	CTT	GAC	CTG	CAA	1440
Q	L	Y	K	T	R	D	E	K	Y	L	L	D	L	Q	480
AGG	GTC	AGT	GGA	CCA	CAA	CTC	CTC	TTT	CTG	GAC	TTG	TGT	TCC	GCC	1485
R	V	S	G	P	Q	L	L	F	L	D	L	C	S	A	495
TTT	CTA	ACG	CAG	CTG	AGA	GTT	CTT	TGA	1512						
F	L	T	Q	L	R	V	L	*	503						

Tabla II. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de ZmSnRK1b

ATG	GAT	GGA	AGT	AGT	AAA	GGG	AGT	GGG	CAT	TCT	GAA	GCA	TTA	AGG	45
M	D	G	S	S	K	G	S	G	H	S	E	A	L	R	15
AAC	TAC	AAC	CTG	GGA	AGA	ACT	TTA	GGT	ATC	GGT	ACA	TTT	GGA	AAA	90
N	Y	N	L	G	R	T	L	G	I	G	T	F	G	K	30
GTG	AAG	ATT	GCA	GAG	CAT	AAG	CTT	ACT	GGA	CAT	AGG	GTT	GCT	ATA	135
V	K	I	A	E	H	K	L	T	G	H	R	V	A	I	45
AAG	ATC	ATC	AAC	TGC	CGC	CAA	ATG	AGA	AAT	ATG	GAA	ATG	GAA	GAG	180
K	I	I	N	C	R	Q	M	R	N	M	E	M	E	E	60
AAA	GCA	AAG	AGA	GAA	TTC	AAG	ATA	TTG	AAG	TTG	GTC	ATT	CAC	CCC	225
K	A	K	R	E	F	K	I	L	K	L	V	I	H	P	75
CAT	ATC	ATT	CGG	CTT	TAT	GAG	GTC	ATA	TAC	ACA	TCT	ACA	GAT	ATA	270
H	I	I	R	L	Y	E	V	I	Y	T	S	T	D	I	90
TAT	GTT	GTG	ATG	GAA	TAT	TGT	AAG	TAT	GGC	GAG	TTA	TTT	GAT	TAC	315
Y	V	V	M	E	Y	C	K	Y	G	E	L	F	D	Y	105
ATT	GTT	GAG	AAA	GGC	AGA	TTA	CAG	GAA	GAT	GAA	GCT	CGT	CGA	ATC	360
I	V	E	K	G	R	L	Q	E	D	E	A	R	R	I	120
TTC	CAG	CAG	ATC	ATA	TCT	GGC	GTC	GAA	TAC	TGC	CAT	AGA	AAC	ATG	405
F	Q	Q	I	I	S	G	V	E	Y	C	H	R	N	M	135
GTT	GTC	CAC	CGT	GAC	CTA	AAG	CCG	GAA	AAC	TTG	TTA	CTT	GAT	TCA	450
V	V	H	R	D	L	K	P	E	N	L	L	L	D	S	150
AAG	TAT	AAT	GTA	AAA	CTT	GCG	GAT	TTT	GGT	CTG	AGC	AAT	GTC	ATG	495
K	Y	N	V	K	L	A	D	F	G	L	S	N	V	M	165
CAT	GAT	GGC	CAT	TTT	CTG	AAG	ACT	AGC	TGT	GGG	AGT	CCG	AAC	TAT	540
H	D	G	H	F	L	K	T	S	C	G	S	P	N	Y	180
GCT	GCT	CCA	GAG	GTA	ATA	TCT	GGT	AAA	CTA	TAT	GCT	GGA	CCT	GAG	585
A	A	P	E	V	I	S	G	K	L	Y	A	G	P	E	195
GTC	GAT	GTA	TGG	AGT	TGT	GGG	GTG	ATT	CTT	TAT	GCT	CTT	CTT	TGT	630
V	D	V	W	S	C	G	V	I	L	Y	A	L	L	C	210
GGA	ACT	CTT	CCA	TTT	GAT	GAT	GAG	AAT	ATT	CCC	AAT	CTG	TTC	AAA	675
G	T	L	P	F	D	D	E	N	I	P	N	L	F	K	225
AAA	ATT	AAG	GGA	GGT	ATC	TAC	ACA	CTT	CCA	AGT	CAT	TTA	TCT	GCT	720
K	I	K	G	G	I	Y	T	L	P	S	H	L	S	A	240
TTG	GCC	AGG	GAT	TTG	ATC	CCA	CGA	ATG	CTT	GTT	GTT	GAG	CCT	ATG	765
L	A	R	D	L	I	P	R	M	L	V	V	E	P	M	255
AAG	AGA	ATC	ACA	ATT	AGG	GAA	ATT	CGG	GAG	CAT	CAA	TGG	TTC	CAG	810
K	R	I	T	I	R	E	I	R	E	H	Q	W	F	Q	270
ATT	CGC	CTT	CCA	CGT	TAC	TTG	GCA	GTG	CCT	CCA	CCA	GAT	ACG	ACA	855
I	R	L	P	R	Y	L	A	V	P	P	P	D	T	T	285
CAA	CAA	GCC	AAA	ATG	ATT	GAT	GAA	GAT	ACA	CTT	CGA	GAT	GTT	GTT	900
Q	Q	A	K	M	I	D	E	D	T	L	R	D	V	V	300
AAT	ATG	GGA	TTT	AAC	AAG	AAC	CAT	GTG	TGT	GAA	TCA	CTG	TGC	AGC	945
N	M	G	F	N	K	N	H	V	C	E	S	L	C	S	315
AGA	CTT	CAA	AAT	GAG	GCA	ACT	GTT	GCA	TAT	TAT	TTA	CTA	TTG	GAC	990
R	L	Q	N	E	A	T	V	A	Y	Y	L	L	L	D	330
AAT	CGG	TTT	AGA	GCA	ACT	AGT	GGC	TAT	CTT	GGG	GCA	GAT	TAT	CAA	1035
N	R	F	R	A	T	S	G	Y	L	G	A	D	Y	Q	345

GAA	TCA	ATG	GAC	AGG	AAT	TTA	AAT	CAG	CTG	GCG	TCA	TCT	GAA	TCA	1080
E	S	M	D	R	N	L	N	Q	L	A	S	S	E	S	360
TCT	AGT	TCT	GGT	ACG	AGG	AGT	TAT	GTT	CCA	GGA	AGC	AGT	GAT	CCT	1125
S	S	S	G	T	R	S	Y	V	P	G	S	S	D	P	375
CAT	AGC	AGT	GGT	TTG	CGG	CCA	TAT	TAT	CCT	GTT	GAA	AGA	AAA	TGG	1170
H	S	S	G	L	R	P	Y	Y	P	V	E	R	K	W	390
GCG	CTT	GGA	CTT	CAG	TCT	CGG	GCC	CAC	CCT	CGT	GAA	ATA	ATG	GTT	1215
A	L	G	L	Q	S	R	A	H	P	R	E	I	M	V	405
GAG	GTC	TTA	AAA	GCA	CTT	CAA	GAA	TTA	AAC	GTC	AGA	TGG	AAG	AAG	1260
E	V	L	K	A	L	Q	E	L	N	V	R	W	K	K	420
AAT	GGG	CAC	TAC	AAC	GTG	AAA	TGC	AGA	TGG	TGC	CCA	GGG	TTT	CCT	1305
N	G	H	Y	N	V	K	C	R	W	C	P	G	F	P	435
GAA	GTT	AAT	GAC	ACG	TTA	GAT	GCC	AGC	AAC	AGC	TTT	CTT	GGT	GAC	1350
E	V	N	D	T	L	D	A	S	N	S	F	L	G	D	450
TCT	ACC	ATC	ATG	GAT	AAT	GAT	GAT	GCA	AAT	GGG	AGG	CTA	CCT	ACT	1395
S	T	I	M	D	N	D	D	A	N	G	R	L	P	T	465
GTG	ATC	AAG	TTT	GAA	TTC	CAG	CTT	TAC	AAG	ACG	AAG	GAC	GAC	AAG	1440
V	I	K	F	E	F	Q	L	Y	K	T	K	D	D	K	480
TAC	CTC	CTA	GAT	ATG	CAG	AGA	GTT	ACT	GGA	CCT	CAG	CTG	CTC	TTC	1485
Y	L	L	D	M	Q	R	V	T	G	P	Q	L	L	F	495
CTT	GAC	TTC	TGT	GCG	GCC	TTC	CTT	ACC	AAG	CTT	AGG	GTT	CTA	TAG	1530
L	D	F	C	A	A	F	L	T	K	L	R	V	L	*	510

Tabla III. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de Zmβ1

ATG	GGA	AAC	GCC	AGC	GGC	CGC	GAG	GAG	GAC	GCT	GCA	GCT	GTT	GAC	45
M	G	N	A	S	G	R	E	E	D	A	A	A	V	D	15
GGC	GAC	GGC	GCC	GAC	GTG	GAG	GAC	GGC	GGA	GGG	GAC	TCG	TCG	GTC	90
G	D	G	A	D	V	E	D	G	G	G	D	S	S	V	30
CGC	TCG	TCG	GAG	CGC	GCC	TTT	CCG	CCG	TAC	GGC	AGC	GTA	GGA	GCC	135
R	S	S	E	R	A	F	P	P	Y	G	S	V	G	A	45
AAC	CAC	GTG	CGG	CGC	GCG	TGC	TCG	GTG	GGT	GTC	GTA	GGT	GGC	GGT	180
N	H	V	R	R	A	C	S	V	G	V	V	G	G	G	60
GGA	GGC	GCC	GGA	TCG	CCA	CCC	GGG	AGT	CCT	GGC	CAC	TCG	CTC	TCG	225
G	G	A	G	S	P	P	G	S	P	G	H	S	L	S	75
CCG	CGG	ATG	TTC	GTG	CCC	CAG	ACC	CCT	GTA	CCT	CCA	CTG	CAA	AGG	270
P	R	M	F	V	P	Q	T	P	V	P	P	L	Q	R	90
GCT	GCT	GAT	GTA	ACT	CCA	GTG	TTC	AAC	CAG	ATA	TTG	ATG	AAT	GAT	315
A	A	D	V	T	P	V	F	N	Q	I	L	M	N	D	105
CAA	GAA	GAA	GAA	TAT	GAT	GGC	CCC	CCT	CAA	AAG	GAA	ATT	CCT	TCT	360
Q	E	E	E	Y	D	G	P	P	Q	K	E	I	P	S	120
TTA	ATT	GTC	TGG	ACC	CTT	GGA	GGA	AAG	AAT	GTA	TAT	GTT	GAA	GGA	405
L	I	V	W	T	L	G	G	K	N	V	Y	V	E	G	135
TCA	TGG	GAT	AAC	TGG	AAA	TCA	AGA	AAA	GCC	ATG	CAA	AAA	TCT	GGG	450
S	W	D	N	W	K	S	R	K	A	M	Q	K	S	G	150
AAA	GAT	CAC	TCT	CTT	TTG	CTG	GTA	CTC	CCG	TCA	GGA	GTT	TAC	CGA	495
K	D	H	S	L	L	L	V	L	P	S	G	V	Y	R	165
TAC	AGA	TTT	GTT	GTA	GAT	GGA	GAA	AGG	AGA	TGC	CTT	CCT	GAC	CTT	540
Y	R	F	V	V	D	G	E	R	R	C	L	P	D	L	180
CCC	TGT	GAA	ACT	GAT	GCA	ATG	GGC	AAT	GCG	GTT	AAC	CTT	CTT	GAT	585
P	C	E	T	D	A	M	G	N	A	V	N	L	L	D	195
GTT	AAT	GAT	TTT	GTC	CCA	GAA	AGT	GTT	GAG	AGC	GTG	GTA	GAA	TTT	630
V	N	D	F	V	P	E	S	V	E	S	V	V	E	F	210
GAG	CCA	CCG	CTT	TCT	CCA	GAC	TCT	AGC	TAC	AGT	TTC	CAG	GCA	CCT	675
E	P	P	L	S	P	D	S	S	Y	S	F	Q	A	P	225
GAG	GAC	AAG	GAC	TTC	GCC	AAG	GAG	CCA	CCT	GCT	CTT	CCA	GCT	CAA	720
E	D	K	D	F	A	K	E	P	P	A	L	P	A	Q	240
CTC	CAT	CTC	GGC	GTC	CTT	AAC	TCA	CAG	AAC	TCG	GAA	GAA	AGC	TGC	765
L	H	L	G	V	L	N	S	Q	N	S	E	E	S	C	255
GCG	CGG	CCG	CAG	CAC	ATA	GTC	CTC	AAT	CAC	CTC	TTC	ATA	GAG	AAG	810
A	R	P	Q	H	I	V	L	N	H	L	F	I	E	K	270
GGC	TGG	GGC	GCC	CAC	CCC	CTG	GTG	GCT	CTC	GGC	CTA	ACC	CAC	AGG	855
G	W	G	A	H	P	L	V	A	L	G	L	T	H	R	285
TTC	GAG	TCC	AAA	TAT	GTA	ACC	CTC	GTC	CTG	TAC	AAA	CCC	ATC	GAA	900
F	E	S	K	Y	V	T	L	V	L	Y	K	P	I	E	300
CGA															
R															

TTG	CTG	CAT	GAT	GTC	ATC	ACT	TGC	AAA	AAG	GAT	GAT	ACA	ATC	AAG	1089
L	L	H	D	V	I	T	C	K	K	D	D	T	I	K	363
GAC	ATC	ATA	CTG	AAG	CTG	GAC	TCT	GAG	AAG	ATC	CAC	AGG	ATC	TAC	1134
D	I	I	L	K	L	D	S	E	K	I	H	R	I	Y	378
GTT	GTG	GAT	GAC	AAA	GGG	AAC	ACC	GAG	GGA	GTC	ATC	ACC	TTG	AGG	1179
V	V	D	D	K	G	N	T	E	G	V	I	T	L	R	393
GAC	ATA	ATC	TCC	AAG	CTG	GTG	CAT	GAG	CCA	CGC	CAT	TAC	TTT	GGG	1224
D	I	I	S	K	L	V	H	E	P	R	H	Y	F	G	408
GAT	TTC	TTT	GAT	GGT	GTT	GTT	CCC	CTG	CCT	GCA	AAC	AGC	ACC	GTA	1269
D	F	F	D	G	V	V	P	L	P	A	N	S	T	V	423
GGA	TCC	AAT	CGG	ATC	CCG	GGC	CCG	TCG	ACT	GCA	GAG	GCC	TGC	ATG	1314
G	S	N	R	I	P	G	P	S	T	A	E	A	C	M	438
CAA	GCT	TTC	CCT	ATA	GTG	AGT	CGT	ATT	AGA	GCT	TGG	CGT	TAA	1416	
Q	A	F	P	I	V	S	R	I	R	A	W	R	*	471	

Tabla V. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de Zmy2

ATG	GAT	CAA	CCT	GAG	GAA	AAC	CCT	GAA	TTC	CCA	AGC	TGT	GAT	GCC	45
M	D	Q	P	E	E	N	P	E	F	P	S	C	D	A	15
TAC	TTT	GAA	GCT	ATC	CAG	TCC	AAG	AAG	AAG	TTG	CCA	CTG	ACT	TTG	90
Y	F	E	A	I	Q	S	K	K	K	L	P	L	T	L	30
CAA	GAA	TCA	CTA	ACT	GCT	GCC	TTT	GCT	CAG	ATT	CCA	GTC	TCA	TCC	135
Q	E	S	L	T	A	A	F	A	Q	I	P	V	S	S	45
TTC	CCT	GAG	GTT	CCA	GCT	GGT	CGA	GTA	ATT	GAA	ATT	CCT	GGT	GAT	180
F	P	E	V	P	A	G	R	V	I	E	I	P	G	D	60
ACT	TCT	GTT	ATT	GAT	GCT	GTA	AGG	ACT	CTC	TCT	GAA	CAG	AAC	ATA	225
T	S	V	I	D	A	V	R	T	L	S	E	Q	N	I	75
AGG	GCA	GCA	CCA	GTA	CTG	AAT	CCA	GAA	CCT	GGG	GCT	CCT	ACT	GAT	270
R	A	A	P	V	L	N	P	E	P	G	A	P	T	D	90
TGG	CAG	GGG	AGG	TAC	CTT	GGT	GTC	ATC	GAT	TAC	TCG	GCA	ATC	ATC	315
W	Q	G	R	Y	L	G	V	I	D	Y	S	A	I	I	105
CTT	TGG	GTA	CTA	GAA	AAT	GCT	GAG	CTT	GCT	GCT	GTT	GCA	CTC	TCG	360
L	W	V	L	E	N	A	E	L	A	A	V	A	L	S	120
GCT	GCA	TCG	GCA	ACT	GCT	GCT	GGA	GTT	GGC	ATG	GGT	GCT	GTT	GGT	405
A	A	S	A	T	A	A	G	V	G	M	G	A	V	G	135
GCT	GTT	GGG	GTG	GCA	GCT	TTG	GGA	ACA	ACT	GGC	CCA	GCT	GCT	GTA	450
A	V	G	V	A	A	L	G	T	T	G	P	A	A	V	150
GCT	GGC	TTA	ACT	GCA	GCT	GCA	ATT	GGG	GCT	TCT	GTT	GCT	GGT	GGA	495
A	G	L	T	A	A	A	I	G	A	S	V	A	G	G	165
TTA	ACT	GCT	GAA	AAG	GGT	GTG	GCG	AAG	GAT	GGG	CTA	ACT	GCT	GCA	540
L	T	A	E	K	G	V	A	K	D	G	L	T	A	A	180
GAT	CAT	TTA	GGG	GAG	GAT	TTC	TAC	AAA	GTT	TTA	CTT	CAG	CAG	GAA	585
D	H	L	G	E	D	F	Y	K	V	L	L	Q	Q	E	195
CCT	TTC	AGA	TCA	ACA	ACA	GTT	CGA	TCG	ATT	GTT	GAG	TCG	TAC	CGC	630
P	F	R	S	T	T	V	R	S	I	V	E	S	Y	R	210
TGG	TCT	CCT	TTT	GTC	CCC	ATT	ACA	CTG	GAC	ACT	TCC	ATG	CTG	ACT	675
W	S	P	F	V	P	I	T	L	D	T	S	M	L	T	225
GTA	CTT	CTG	TTG	CTC	TCT	AAG	TAC	AGA	TTG	CGA	AAT	GTC	CCT	GTG	720
V	L	L	L	L	S	K	Y	R	L	R	N	V	P	V	240
ATT	GAG	CCT	GAA	AAG	CCT	ATC	ATC	AGG	AAT	TTC	ATT	ACT	CAG	ACT	765
I	E	P	E	K	P	I	I	R	N	F	I	T	Q	T	255
GGT	GTT	GTC	AAA	GGG	CTG	CAG	CAA	TGT	AAA	GGA	AGG	GAC	TGG	TTT	810
G	V	V	K	G	L	Q	Q	C	K	G	R	D	W	F	270
GAC	TAC	ATT	TCT	GCA	CTT	CCT	CTT	TCA	GAC	TTA	GGA	CTT	CCA	TTT	855
D	Y	I	S	A	L	P	L	S	D	L	G	L	P	F	285
ATG	TCC	ATT	GAT	GAG	GTT	ATC	ACC	GTC	AAC	AGT	GAT	GAT	CTT	ATC	900
M	S	I	D	E	V	I	T	V	N	S	D	D	L	I	300
TTA	GAA	GCT	TTC	AAG	TGC	ATG	AAG	GAT	ACC	AAG	ATT	GGT	GGT	GTC	945
L	E	A	F	K	C	M	K	D	T	K	I	G	G	V	315
CCA	GTA	GTA	GAA	GGC	CCC	AAA	AGA	AAA	CTT	GTT	GGC	AGT	GTT	AGC	990
P	V	V	E	G	P	K	R	K	L	V	G	S	V	S	330
ATA	AGG	GAC	ATC	CGC	TTT	CTG	TTG	CTT	AGA	CCC	AAC	TTA	TTT	TCA	1035
I	R	D	I	R	F	L	L	L	R	P	N	L	F	S	345

AAT	TTC	AGG	CAG	TTG	ACA	GTC	ATT	GAA	TTC	ATG	AAG	ACT	CTA	GGC	1080
N	F	R	Q	L	T	V	I	E	F	M	K	T	L	G	360
TCC	ACT	CTT	CCT	GAT	TCA	GAG	AGC	AAT	TGC	CTG	GTG	AAG	CCA	CCA	1125
S	T	L	P	D	S	E	S	N	C	L	V	K	P	P	375
CCC	ACT	TGC	ACT	CCT	GAC	GCT	TCC	CTT	GGT	AGT	GTT	ATT	GAC	AGC	1170
P	T	C	T	P	D	A	S	L	G	S	V	I	D	S	390
ATT	GCA	TCA	AGA	ATA	ACA	CAC	AGG	ATA	TAT	GTA	GTG	GAT	GAT	GAC	1215
I	A	S	R	I	T	H	R	I	Y	V	V	D	D	D	405
CTT	GAG	GTT	GTT	GGT	GTT	GTG	ACT	CTG	CGT	GAT	GTG	ATC	TCA	TGC	1260
L	E	V	V	G	V	V	T	L	R	D	V	I	S	C	420
TTT	ATT	CAT	GAG	CCA	CCC	GGT	TAT	TGC	GAC	AAC	TAT	TTG	GCT	TCA	1305
F	I	H	E	P	P	G	Y	C	D	N	Y	L	A	S	435
GCG	ATG	GAG	AAG	CTT	GAG	GGG	AAA	GGA	GTC	AGA	TCA	GTG	GAG	AAA	1350
A	M	E	K	L	E	G	K	G	V	R	S	V	E	K	450
ATT	TGA	1356													
I	*														

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	13
1. Señalización por azúcares	14
1.1 Vías de señalización por glucosa en levadura.....	14
1.2 Vía de señalización por azúcares en plantas	17
1.2.1 El papel de los azúcares en el desarrollo y la adaptación ambiental	18
1.2.2 Interacción de las vías de señalización de azúcares con vías hormonales.....	19
1.2.3 Mecanismos de percepción y transducción de la señal de azúcares en plantas.....	22
2. La familia SNF1/AMPK/SnRK1	25
2.1 Composición y estructura del complejo SNF1: similitudes y diferencias entre los tres reinos.....	26
2.1.1. Componentes del complejo.....	26
2.1.2 Subunidades atípicas y nuevos modelos de complejo.....	29
2.1.3 Estructura del complejo: cristalización de diferentes dominios.	33
2.2 Mecanismos de modulación de la actividad de SNF1/AMPK/SnRK1	35
2.3 SNF1/AMPK/SnRK1 en el control del metabolismo y otras funciones	38
2.3.1 SNF1, de la fermentación a la respiración	38
2.3.2 AMPK, control del metabolismo global del organismo.....	38
2.3.3 SnRK1, ¿control del metabolismo global en plantas?.....	39
II. OBJETIVOS	43
III. RESULTADOS	47
ANTECEDENTES	49
Capítulo I: Caracterización de la proteína ZmAKIN$\beta\gamma$	51
1.1 Caracterización estructural de la proteína ZmAKIN$\beta\gamma$	53
1.1.1 Sobreexpresión y purificación del dominio KIS.....	53
1.1.2 Interacción del dominio KIS con otras proteínas con el mismo dominio	57
1.1.3 Obtención de anticuerpos policlonales contra el dominio KIS y la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$	58
1.2 Estudio del patrón de expresión de ZmAKIN$\beta\gamma$	59
1.2.1 Estudio de la expresión del mRNA de ZmAKIN $\beta\gamma$ ante estrés osmótico	59
1.2.2 Estudio de la acumulación de la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$	60
1.3 Interacción de la proteína ZmAKIN$\beta\gamma$ con subunidades catalíticas SnRK	61
1.4 Estudio de la localización subcelular de la proteína ZmAKIN$\beta\gamma$	63
Capítulo II: Identificación de nuevos componentes del complejo SnRK1 de maíz	65
2.1 Identificación de nuevas subunidades del complejo SnRK1	67
2.1.1 Identificación y aislamiento de clones codificantes para subunidades catalíticas SnRK1	67
2.1.2 Identificación y aislamiento de clones codificantes para subunidades β del complejo SnRK1	72
2.1.3 Identificación y aislamiento de clones codificantes para subunidades γ del complejo SnRK1	74
2.2 Estudio de la expresión de las subunidades ZmSnRK1	77
2.3 Estudio funcional en levadura de las subunidades ZmSnRK1	79
2.4 Análisis de interacciones entre subunidades mediante ensayos de doble híbrido en levadura	80
2.5 Expresión de las subunidades catalíticas ZmSnRK1 en E.coli y ensayos de actividad.	81
2.6 Estudio de la localización subcelular de las proteínas ZmSnRK1a y ZmSnRK1b	85
2.7 Identificación de proteínas que interactúan con ZmSnRK1b	91
2.8 Interacción entre MnSOD y ZmSnRK1b	96
2.8.1 El clon 14 codifica para una Superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD 3-1) ..	96
2.8.2 Estudio del dominio de interacción de ZmSnRK1b con MnSOD	98
2.8.3 Transformación transitoria en protoplastos de ZmSnRK1b y MnSOD: estudios <i>in vivo</i>	99
2.8.4 Modulación de la actividad MnSOD	101
2.8.5 Localización subcelular de la proteína 14-2h	102
IV. DISCUSIÓN	107
Capítulo I: Caracterización de la subunidad ZmAKIN$\beta\gamma$	107
Capítulo II: Identificación y caracterización de diferentes subunidades del complejo SnRK1 de maíz	110
V. MATERIAL Y MÉTODOS	127
1. MATERIAL	129
1.1 Material vegetal y tratamientos.....	129
1.2 Cepas bacterianas	129
1.3 Cepas de levadura	129
1.4 Medios	129
1.4.1 Medios bacterianos	129

1.4.2 Medios de levadura	130
1.4.3 Medios de plantas	130
1.5 Librería de cDNA , plásmidos y construcciones.....	131
1.5.1 Librería de doble híbrido de embriones de maíz.....	131
1.5.2 Plásmidos utilizados.....	131
1.5.3 Construcciones utilizadas.....	132
1.5.4 Oligonucleótidos utilizados.....	133
1.6 Anticuerpos utilizados	134
2. MÉTODOS	135
2.1 Preparación y transformación de células competentes.....	135
2.2 Extracción y purificación de DNA plasmídico de E.coli (pequeña escala)	135
2.3 Extracción y purificación de DNA a gran escala.....	136
2.4 Electroforesis de DNA.....	136
2.5 Digestión, defosforilación, purificación y ligación.....	136
2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	137
2.7 RT-PCR.....	137
2.8 Extracción de RNA total.....	138
2.9 Análisis Northern.....	139
2.9.1 Electroforesis de RNA.....	139
2.9.2 Transferencia a membrana de nylon	139
2.9.3 Hibridación de ácidos nucleicos.....	140
2.10 Métodos generales de análisis y purificación de proteínas	141
2.10.1 Preparación de extractos proteicos.....	141
2.10.2 Cuantificación de proteínas.....	141
2.10.3 Electroforesis monodimensional SDS-PAGE	141
2.10.4 Electroforesis bidimensional.....	142
2.10.5 Transferencia de proteínas a membranas PVDF	143
2.10.6 Inmunodetección.....	143
2.10.7 Tinción de geles con azul de Coomassie.....	143
2.10.8 Tinción de geles con plata.....	144
2.10.9 Expresión y purificación de proteínas recombinantes fusionadas a GST	144
2.10.10 Purificación del dominio KIS mediante FPLC	145
2.10.11 Expresión y purificación de proteínas fusionadas a cola de histidinas.....	146
2.10.12 Producción de anticuerpos policlones contra el dominio KIS y la proteína ZmAKIN $\beta\gamma$	146
2.11 Aislamiento de protoplastos y transformación transitoria en células de Arabidopsis thaliana	147
2.11.1 Aislamiento de protoplastos.....	147
2.11.2 Transformación de protoplastos.....	147
2.11.3 Aislamiento de proteínas de protoplastos:	148
2.12 Transformación transitoria por biolística.....	148
2.12.1 Preparación de las partículas de oro.....	149
2.12.2 Precipitación de las muestras de DNA.....	149
2.12.3 Disparo de los microproyectiles.....	149
2.12.4 Tinción Mitotracker	150
2.13 Inmunoprecipitación de complejos AKIN $\beta\gamma$ y ensayos de actividad	150
2.14 Ensayo de actividad SAMS	151
2.15 Ensayo de actividad SOD	151
2.16 Traducción y transcripción <i>in vitro</i> (TnT)	152
2.17 Pull-down.....	152
2.18 Ensayos de doble híbrido y complementación de levadura	153
2.18.1 Transformación de levadura	153
2.18.2 Ensayo β -galactosidasa en filtro	154
2.18.3 Extracción de DNA plasmídico de levadura	154
VI. CONCLUSIONES.....	157
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	161
VIII. APÉNDICES	173

