



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio *in vivo* del mecanismo de activación de la Proteína  
Quinasa dependiente de cAMP

Tesis presentada para optar al título de Doctor  
de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Químicas,  
orientación Química Biológica

Paula Portela

Directora: Dra. Silvia Moreno  
Directora asistente: Dra. Silvia Rossi

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Molecular Departamento de  
Química Biológica

Buenos Aires, 2005

Estudio *in vivo* del mecanismo de activación de la Proteína Quinasa dependiente de cAMP.

Resumen.

La proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) es la enzima mejor caracterizada de la familia de las proteínas quinasas que fosforilan residuos serina/treonina. La fosforilación de proteínas blanco es crítica para la regulación de varios procesos celulares, incluyendo metabolismo, expresión génica, crecimiento y muerte celular. Actualmente, no existe un modelo adecuado que permita explicar la variedad de respuesta que genera la vía cAMP-PKA como consecuencia de la acción de drogas diferentes o diversos estímulos del medio ambiente, que actúan estimulando la vía del cAMP. Varios mecanismos controlan la activación espacio-temporal y la especificidad de la respuesta de la PKA. El objetivo general de esta tesis es contribuir a un mejor conocimiento del mecanismo de activación *in vivo* de la PKA. Para este propósito, hemos usado *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental. En primer término, hemos evaluado si la determinación de la actividad PKA empleando células permeabilizadas puede ser un buen indicador de la actividad quinasa en células intactas. En segundo término hemos determinado la actividad *in vivo* de la PKA, y el cambio en el estado de fosforilación de la subunidad catalítica, durante el aumento de cAMP intracelular evocado por un estímulo extracelular (agregado de glucosa a células crecidas en glicerol). Finalmente, hemos caracterizado a la enzima piruvato quinasa 1 (Pyk1) como sustrato de PKA, y evaluamos sus propiedades cinéticas. De los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, concluimos que el uso de células permeabilizadas de levaduras es el método mas apropiado para seguir la activación *in vivo* de la PKA. Por primera vez describimos la fosforilación reversible y dinámica de la subunidad catalítica. Se puede considerar a la fosforilación de la subunidad catalítica como un nuevo mecanismo de control, preciso y reversible, de la actividad PKA en respuesta a las condiciones del medio ambiente. Finalmente, experimentos preliminares con Pyk1 indican que la especificidad del sustrato y su capacidad de participar en el proceso de activación de la PKA depende de la naturaleza estructural de éste.

Palabras Claves: PKA, activación, levaduras, sustrato, glucosa, fosforilación, piruvato quinasa

*In vivo* studies of the mechanism of activation of the cAMP dependent Protein Kinase.

Summary.

The cAMP-dependent protein kinase (PKA) is the most well-characterized member of the serine/threonine protein kinase family. Phosphorylation of its targets is known to be critical for regulating a multitude of cellular processes including metabolism, gene expression, growth and cell death. There are no adequate models, at present, suitable for explaining the variety of responses displayed by the cAMP-PKA system as a consequence of the action of different drugs or several environmental stimuli, that are known to act activating the same cAMP pathway. Several mechanisms control the spatio-temporal activation and specificity of the PKA response.

The general aim of this thesis is to contribute to a better understanding of the *in vivo* mechanism of PKA activation. For this purpose we have used *Saccharomyces cerevisiae* as model. In a first stage, we have evaluated whether measurement of PKA activity in permeabilised yeast cells can give a good indication of the PKA activity in intact cells. In a second stage, we have measured a transient change in the *in vivo* PKA activity, along a cAMP peak produced by an extracellular stimulus (glucose addition to glycerol-growing cells) as well as a change in the phosphorylation state of its catalytic subunit following PKA activation. Finally, we have characterized pyruvate kinase 1 (Pyk1) as a PKA substrate, and evaluated its kinetic properties as a natural substrate.

From the results obtained during this thesis, we conclude that the use of yeast permeabilized cells is the most suitable method to follow the *in vivo* activation of PKA. For the first time, we describe a dynamic and reversible phosphorylation of the catalytic subunit. Reversible phosphorylation can thus be considered a new control mechanism for fine-tuning of PKA activity in response to environmental conditions. Finally, we show that the substrate (Pyk1) shows differential specificity and can participate in the PKA activation process depending on its structural nature.

Key words: PKA, activation, yeast, substrate, glucose, phosphorylation, pyruvate kinase

---

Gracias...

A *Silvia Moreno*, por permitirme realizar mi tesis doctoral en su laboratorio. Por su calidad humana y científica, por su fuerza y entusiasmo. Porque siempre estuvo cerca mío, ayudándome a crecer. Por el laberinto de largas discusiones y razonamientos, que siempre concluyen: ¿pero como será dentro de la célula?...

A *Silvia Rossi*, por su compañerismo y entusiasmo. Por su capacidad y dedicación al trabajo, que se refleja en el funcionamiento de todo el laboratorio. Por su mirada crítica y opinión pertinente sobre cada resultado que obtuve. Por "todas las medias horas" antes de regresar a la vida familiar, en las cuales se nos ocurren las mejores y peores ideas.

A *Vanina Zaremberg*, por enseñarme mis primeros pasos con *Saccharomyces*. Por su constante ayuda desde lejos.

A *Elba Pereyra*, por estar cerca para cualquier consulta o pregunta. Por sus "reflexiones" graciosas e inteligentes que hacen más divertido el trabajo de cada día.

A *Virgi, Patri, Jime, Pía, Jose y Fiorella* por compartir con alegría horas caminando sobre las mismas baldosas, almuerzos y seminarios.

A *los vecinos: Edu, Ceci, Ale, las Marielas, Julieta, Pablo y Abel*, por su disposición a cualquier pedido de auxilio.

A *Liliana, Martín y Luis* por su trabajo desde la Secretaría.

A *Susana, Gladys, Juan y Norma* por "reciclar" el material para cada día.

A mi familia por su cariño y apoyo, *Má, Pá, Fer, Totó y Meli*. A mis abuelos *Sara y David*, por sus caras desorbitadas luego de la eterna pregunta: Pero nena...¿qué tema es tu tesis?.

A *Dami y Mati*, los motores de mi corazón...

---

## Índice

|   |     |
|---|-----|
| Introducción  | 1   |
| Objetivos   | 45  |
| Capítulo 1  |     |
| La actividad de la Proteína Quinasa A determinada en células permeabilizadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> correlaciona con los fenotipos controlados por PKA <i>in vivo</i> . |     |
| 1.1) Introducción   | 48  |
| 1.2) Resultados   |     |
| Actividad de la PKA en extractos crudos   | 50  |
| Actividad de la PKA en células permeabilizadas  | 52  |
| Correlación entre actividad quinasa y fenotipos controlados por PKA   | 55  |
| 1.3) Discusión  | 61  |
| Capítulo 2  |     |
| Activación y fosforilación dependiente de glucosa de la Proteína Quinasa A en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .   |     |
| 2.1) Introducción   | 64  |
| 2.2) Resultados   |     |
| Actividad de PKA <i>in situ</i> durante la señalización inducida por glucosa  | 66  |
| Estado de fosforilación de Tpk1 durante la transición del metabolismo respiratorio al fermentativo  | 72  |
| Análisis de las isoformas de Tpk1 y de la actividad quinasa <i>in situ</i> en cepas mutantes de PKA   | 75  |
| Análisis del estado de fosforilación de Tpk1 durante el metabolismo respiratorio y fermentativo   | 79  |
| Efecto de la fosforilación sobre la actividad catalítica de Tpk1  | 83  |
| 2.3) Discusión  |     |
| Actividad <i>in situ</i> de la PKA en células estimuladas por glucosa   | 86  |
| El cambio dinámico en el estado de fosforilación de Tpk1 es dependiente de la fuente de carbono.  | 88  |
| Capítulo 3  |     |
| Identificación de nuevos sustratos de la Proteína Quinasa A de levaduras, Pyk1 y Pyk2: Caracterización cinética de la fosforilación.  |     |
| 3.1) Introducción   | 92  |
| 3.2) Resultados   |     |
| Sección I: Fosforilación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de las dos isoformas de la piruvato quinasa de levaduras por la PKA   |     |
| Identificación de sustratos de la PKA en levaduras  | 95  |
| Fosforilación <i>in vitro</i> de la Pyk1 y Pyk2 por la PKA  | 98  |
| Reacción de fosforilación de las proteínas GST-Pyk1 y GST-Pyk2: Constantes cinéticas  | 102 |
| Fosforilación <i>in vivo</i> de la Pyk1 y Pyk2 por la PKA   | 104 |

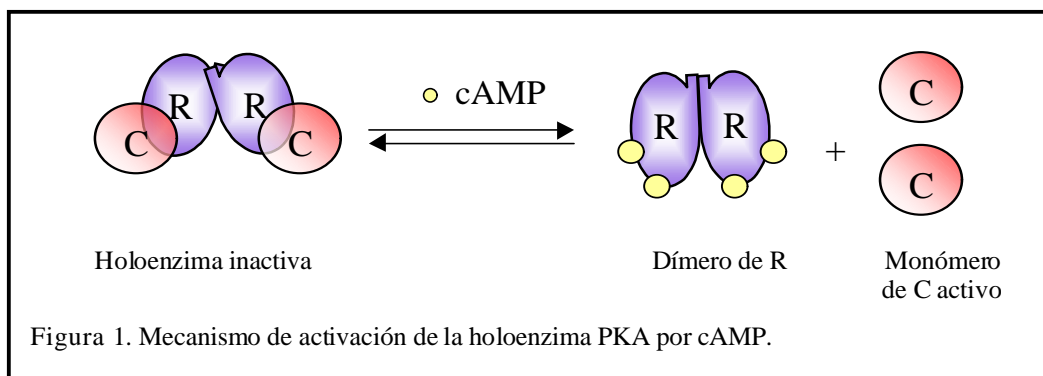
---

|  |     |
|--|-----|
| Sección II: Identificación del sitio de fosforilación en la Pyk1   | 105 |
| Busqueda del sitio de fosforilación  |     |
| Efecto de la mutación en Ser22 sobre la fosforilación de la Pyk1   | 107 |
| Análisis preliminar de la participación del sustrato en el mecanismo de activación de la holoenzima de levaduras | 110 |
| Efecto de la fosforilación sobre la actividad de la piruvato quinasa   | 112 |
| 3.3) Discusión   |     |
| Identificación de dos sustratos de PKA   | 117 |
| Análisis de las propiedades funcionales de un sustrato nativo <i>versus</i> un sustrato peptídico                | 119 |
| La fosforilación de la Pyk1 aumenta la afinidad hacia el fosfoenolpiruvato                                       | 120 |
| <br>   |     |
| Conclusiones generales   | 122 |
| <br>   |     |
| Perspectivas   | 124 |
| <br>   |     |
| Materiales y Métodos   | 126 |
| <br>   |     |
| Bibliografía   | 141 |

*Transducción de señales por cAMP.*

La necesidad de las células de responder frente a variaciones en las condiciones del medio ambiente requiere que éstas sean capaces de detectar cambios y modificar su actividad biológica en forma acordada. Los mecanismos usados para detectar e instalar esos cambios son colectivamente llamados transducción de señales, siendo el mecanismo predominante la fosforilación de proteínas. Este evento reversible involucra, en eucariotas superiores, la transferencia del fosfato  $\gamma$  del ATP a residuos Ser, Thr, o Tyr presentes en la proteína blanco.

La Proteína Quinasa dependiente de cAMP (PKA) es el miembro mejor caracterizado de la familia formada por las proteínas quinasas que fosforilan en residuos Thr y Ser. Ésta sirve como una quinasa prototipo, para el estudio tanto de la señalización a través de segundos mensajeros, como para la fosforilación de proteínas. La holoenzima PKA es un tetrámero formado por dos subunidades regulatorias y dos catalíticas. La subunidad catalítica ( C ) es responsable de catalizar la reacción de transferencia del fosfato, mientras que la subunidad regulatoria ( R ) sirve tanto para conferir dependencia al cAMP, como para localizar la holoenzima en compartimentos subcelulares discretos vía la interacción con proteínas de anclaje de PKA (AKAPs). Cuando la concentración de cAMP aumenta en respuesta a un estímulo celular específico, dos moléculas de cAMP se unen en forma cooperativa, por cada molécula de R. Esta unión promueve la disociación de esta enzima, liberando dos moléculas de C activas y un dímero de R con cuatro moléculas de cAMP unidas (Figura 1).



### *Subunidad catalítica.*

#### *Estructura y función de la subunidad catalítica.*

Existen tres isoformas de la subunidad catalítica en mamíferos, C $\alpha$ , C $\beta$  y C $\gamma$ . Entre C $\alpha$  y C $\beta$ , las secuencias de aminoácidos difieren aproximadamente un 7%. La isoforma C $\alpha$  se expresa constitutivamente en todos los tejidos, mientras que C $\beta$  es tejido específica; la presencia de C $\gamma$  sólo se ha demostrado en testículos. Esta isoforma presenta una identidad del 79% y 83% con C $\alpha$  y C $\beta$  respectivamente (Beebe *et al*, 1990).

La estructura primaria de la subunidad catalítica (Figura 2 B), común a todas las proteínas quinasas, consiste en un núcleo catalítico conservado, de aproximadamente 270 residuos, unido a dos regiones amino y carboxilo terminales, las cuales no se encuentran muy conservadas entre los miembros de la familia. El núcleo catalítico está formado por varios dominios y presenta una organización bi-lobular. El lóbulo pequeño o menor, amino terminal, está compuesto por 5 estructuras del tipo lámina  $\beta$  y una  $\alpha$ -hélice predominante, mientras que el lóbulo grande o mayor, carboxilo terminal, está compuesto principalmente por  $\alpha$ -hélices y es responsable de la unión del sustrato y la catálisis (Figura 2 A) (Huse *et al*, 2002).

El ATP se une en una región formada entre los dos lóbulos, e interacciona con el loop-P, formado por las cadenas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2. Este "loop" contiene un segmento rico en glicinas, GXGX $\emptyset$ G, donde  $\emptyset$  corresponde a Tyr o Phe. Los residuos Gly (G) permiten al loop-P interactuar con el fosfato del ATP y coordinarlo para la interacción con las cadenas laterales de otros residuos. En el lóbulo menor, la Lys72, establece importantes contactos con los grupos fosfatos  $\alpha$  y  $\beta$  del ATP, el cual adopta una posición correcta para la catálisis. La Lys72 está ubicada en la profundidad del bolsillo inter-lóbulo, su orientación y estabilidad se favorecen por la interacción con el residuo Glu91, que pertenece a la hélice-C, única  $\alpha$ -hélice conservada en el lóbulo menor. Esta hélice, además establece contacto directo con la región amino terminal del segmento de activación presente en el lóbulo menor.



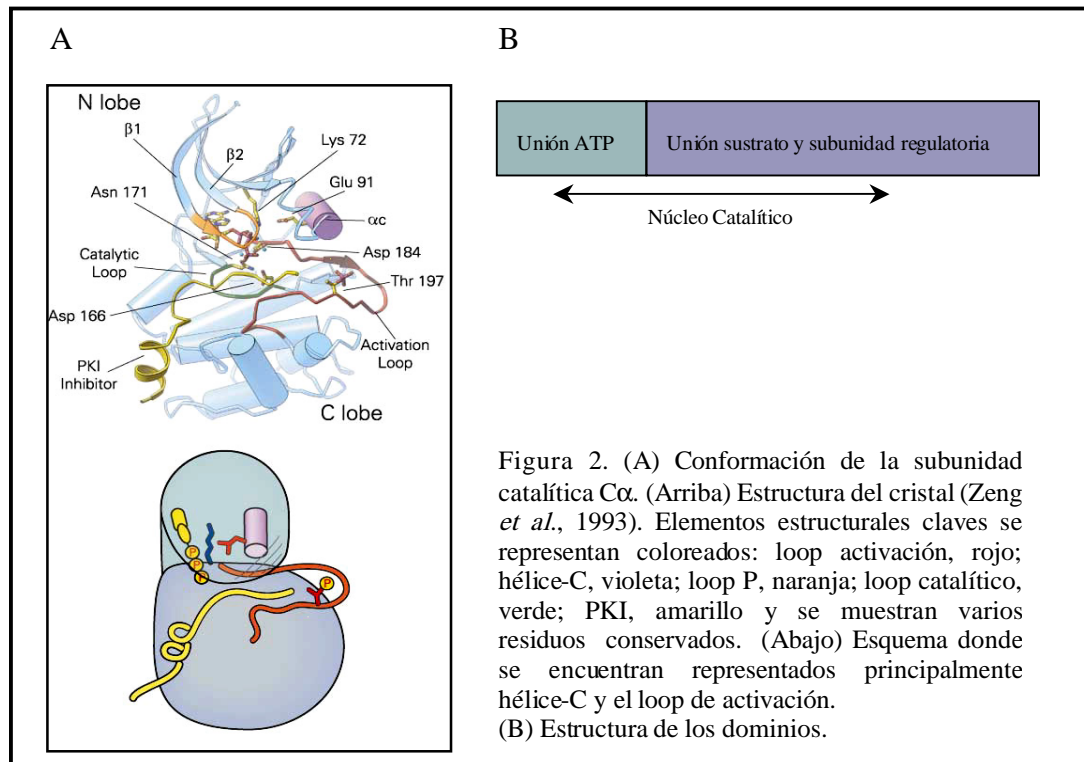
El lóbulo mayor, posee varios motivos conservados: el loop catalítico, el loop responsable del posicionamiento del  $Mg^{2+}$ , el loop de activación y el loop P+1; los últimos tres forman parte del segmento de activación.

La subunidad catalítica generalmente reconoce como sustratos, péptidos que contienen dos aminoácidos básicos separados (posición P-2 y P-3) por uno o dos residuos de la serina o treonina que es fosforilada (posición P-0) (secuencia consenso básica: RRXS/T). Además se ha caracterizado, utilizando péptidos sintéticos, que la posición P-6 es ocupada preferentemente por Arg y la posición P+1, es ocupada por residuos hidrofóbicos (Moore *et al*, 2003).

La óptima fosfotransferencia requiere del arreglo espacial de varios residuos, los cuales se encuentran conservados en todas las quinasas conocidas. El Asp166 y el Asn171 pertenecen al loop catalítico. El Asp166 interactúa con el grupo hidroxilo del sustrato, mientras que Asn171, vía interacciones puente de hidrógeno orienta correctamente al Asp166. Los residuos Asn177 y Asp184 son necesarios para la unión del catión  $Mg^{2+}$ . El Asp184 forma parte de un motivo muy conservado dentro del loop de activación, Asp-Phe-Gly. La estructura de este motivo, y en particular la conformación del Asp184, esta también relacionada con la fosforilación del loop de activación.

Los residuos que participan en el reconocimiento del péptido sustrato se encuentran en el segmento de activación que comprende los residuos 184-208. Este segmento cumple varias funciones: los residuos 184-187 contribuyen al posicionamiento el  $Mg^{+2}$ , los residuos 188-192 forman la hoja  $\beta$  9, la cual contribuye a regular la estructura de todo el segmento.

El sustrato peptídico se une en una conformación “ex tendida”, de manera tal que éste queda cerca del fosfato y del ATP. El loop de activación, típicamente formado por 20-30 residuos, ofrece una plataforma de anclaje para el péptido sustrato. Este loop, tanto en PKA como en varias quinasas, se encuentra fosforilado cuando la quinasa es activa. La fosforilación del loop de activación lo estabiliza en una conformación abierta y extendida, que es permisiva para la unión del sustrato.



En este segmento, el residuo que se fosforila es la Thr197, el cual contacta a la Arg165 y la Arg189 (pertenecen al lóbulo mayor) y la His 87 (pertenecer al lóbulo menor). Los residuos 198-205 se los denominan loop P+1, el cual interacciona con los residuos P+1, P-2 y P-6 sobre el péptido sustrato. Específicamente, se ha descrito que la Tyr204 contribuye al reconocimiento general del sustrato peptídico y el Glu203 interviene en la interacción con el residuo en la posición P-6 (Moore *et al.*, 2003).

#### *Subunidad catalítica de S. cerevisiae*

En levaduras, la subunidad catalítica está codificada por tres alelos parcialmente redundantes en su función: *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*. Las tres proteínas poseen una región carboxilo terminal (300 aminoácidos) que se encuentra conservada en todas las quinasas dependientes de cAMP, y una región amino terminal corta. En la región carboxilo terminal Tpk1 y Tpk3, presentan aproximadamente 88% de identidad; mientras que Tpk2, 76% respecto de los otros dos alelos (Toda *et al.*, 1987b). *In vivo*, Tpk3 presenta baja actividad

quinasa, debido aparentemente a la baja expresión de la proteína (Mazón *et al*, 1993). Tanto Tpk2 como Tpk1 poseen mayor actividad *in vivo* que Tpk3.

Al igual que el cAMP, la actividad PKA es esencial para el crecimiento. La delección de los tres alelos es letal pero la presencia de uno de ellos permite la viabilidad celular. Sin embargo se ha demostrado que cada subunidad catalítica posee diferentes roles en la diferenciación pseudohifal (Pan y Heitman, 2002).

Recientemente, se ha resuelto la estructura cristalina de *Tpk1Δ* en ausencia de ligandos, la cual posee una delección de los primeros 80 aminoácidos. La comparación entre estructuras de Tpk1 y la subunidad catalítica de mamíferos reveló que la proteína presenta una estructura conservada formada por dos lóbulos globulares (Mashhoon *et al*, 2001).

#### *Modificaciones post-traduccionales de la subunidad catalítica.*

La subunidad catalítica de mamíferos posee dos tipos de modificaciones post traduccionales. El residuo amino terminal posee un grupo mirístico el cual estabiliza la estructura secundaria de C (Zheng *et al*, 1993). Además la subunidad catalítica expresada en *E. coli* es fosforilada en cuatro residuos: Ser10, Ser139, T197 y Ser338. A través del reemplazo de estos residuos por Alanina se analizó el rol que cumple la fosforilación en la estructura y actividad de la enzima: 1) mutante Ser10Ala: Proteína insoluble, inactiva y defosforilada; lo que sugiere que la fosforilación del residuo Ser10 contribuiría de forma general en la estabilidad de la estructura de la proteína. 2) mutante Ser139Ala: No afectó los parámetros cinéticos, la estabilidad de la proteína ni la fosforilación de otros residuos. 3) mutante Ser338Ala: No afectó las propiedades cinéticas, pero sí afectó la estabilidad de la proteína. 4) mutante Thr197Ala: Provoca una disminución en la actividad catalítica (aumenta la  $K_m$  tanto para el sustrato como para el  $Mg^{2+}$ ) y afecta la interacción con la subunidad regulatoria. La fosforilación es muy estable, es resistente a la defosforilación *in vitro* y por lo tanto, no puede ser re-fosforilada *in vitro* (Yonemoto *et al*, 1997).

Cuando se purifica de tejidos, la subunidad C es una proteína madura y activa, aislándose siempre fosforilada en el residuo Thr197, el cual pertenece al loop de activación.

Se ha identificado a la proteína quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinosítido (PKB-1) como una quinasa “que activa” vía fosforilación a varias quinasas, entre las cuales se encuentran

PKC, S6 quinasa, y PKA. Específicamente en el caso de PKA, se ha demostrado *in vitro*, que PDK1 fosforila la subunidad C en el residuo Thr197. Hasta el presente no se conoce el mecanismo *in vivo* que media dicha fosforilación. A través del empleo de mutantes, se ha podido concluir que el mecanismo de maduración de la subunidad catalítica en células eucariotas no es a través de la autofosforilación, sino que una quinasa heteróloga, con propiedades similares a PDK-1, sería responsable de la fosforilación *in vivo* de PKA (Moore *et al*, 2002).

A través del análisis en electroforesis bi-dimensional, la subunidad catalítica Tpk1 de levaduras ha sido descrita como una fosfoproteína. Tpk1 aparece distribuída en varios spots y el análisis de fosfoaminoácidos reveló que ésta contiene fosfotreonina y fosfoserina (Levin y Zoller, 1990). Comparando las secuencias primarias de Tpk1 y C $\alpha$  bovina puede observarse que sólo se conservan los residuos equivalentes a la Ser10 y la Thr197, éstos son la Ser28 y la Thr241 en la isoforma Tpk1.

Sólo la Thr241 se encontró fosforilada en el cristal de *Tpk1* $\Delta^{1-80}$  (Mashhoon *et al*, 2001), lo que indica que el resto de posibles residuos a ser fosforilados se encontrarían en la región amino terminal delecionada o se requeriría de ésta para su fosforilación.

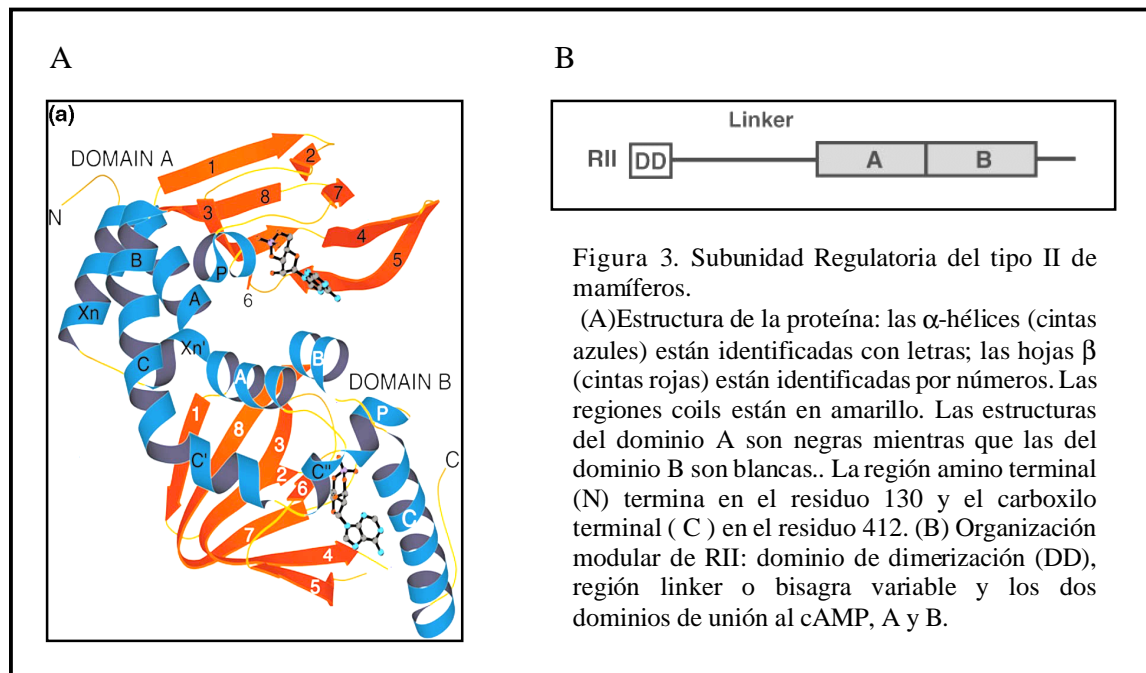
El rol de la fosforilación del residuo Thr241 en Tpk1 se encuentra bien caracterizado. La mutación de Thr241Ala reduce la afinidad por la subunidad regulatoria aproximadamente 30 veces y resulta en una subunidad catalítica monomérica e independiente de cAMP (Levin y Zoller, 1990).

### *Subunidad Regulatoria.*

#### *Estructura / función de la subunidad regulatoria.*

A excepción del receptor de cAMP de *Dictyostelium discoideum*, los canales iónicos regulados directamente por cAMP y los factores intercambiadores de guanina activados por cAMP, Epac1 y Epac2, los principales efectos del cAMP son mediados por la PKA a través de la unión del nucleótido cíclico a su subunidad regulatoria (Kopperud *et al*, 2003). La subunidad R posee una organización modular conservada (Figura 3 B), la cual está formada por un dominio de dimerización y localización en el amino terminal y dos dominios de unión al cAMP contiguos en la región carboxilo terminal. La región bisagra (o

linker) contiene una secuencia inhibitoria similar a un sustrato que bloquea el sitio activo de la subunidad catalítica. Cada subunidad regulatoria une cooperativamente dos moléculas de cAMP y concomitantemente libera la subunidad catalítica activa.



La Figura 3 A muestra la estructura derivada del cristal de la proteína mutante RII $\beta$  (Diller *et al*, 2001). La estructura presenta dos grupos de láminas  $\beta$ , unidas e interconectadas por  $\alpha$  hélices conservadas. Los dominios de unión al cAMP son topológicamente similares y cada uno está formado por ocho láminas  $\beta$  y cuatro  $\alpha$  hélices. La láminas  $\beta$  forman un núcleo conservado para la unión del fosfato del cAMP.

La subunidad regulatoria se asocia a otras macromoléculas lo cual restringe específicamente cada isoforma a distintos compartimentos subcelulares. La subunidad R, además de su función regulatoria protege a la subunidad C de la proteólisis, controlando de esta manera la degradación de la C. En mamíferos existen dos tipos de subunidad R: tipo I (RI $\alpha$  y RI $\beta$ ) y tipo II (RII $\alpha$  y RII $\beta$ ). Si bien las isoformas de R presentan una organización estructural similar, RI y RII difieren en varios aspectos: peso molecular, punto isoelectrico,

secuencia primaria, capacidad de autofosforilación, estructura y expresión tejido-específico (Diller *et al*, 2001).

*Subunidad regulatoria de Saccharomyces cerevisiae.*

En *S.cerevisiae*, existe solo un gen que codifica para la subunidad regulatoria, *BCY1*, el cual es funcionalmente homólogo a RII de mamíferos (Toda *et al*, 1987). La comparación entre las secuencias primarias de Bcy1 y las subunidades de bovino RI y RII, indica que la subunidad regulatoria de levaduras presenta 40% de identidad con éstas.

Bcy1 posee los tres dominios principales presente en las proteínas de mamíferos (Figura 3 B). La región amino terminal, 40-50 aminoácidos más larga que RII, presenta determinantes aminoacídicos para la dimerización, pero no exhibe homología con la R de mamíferos (ver mecanismo de localización). La región carboxilo terminal consiste en dos sitios de unión a cAMP contiguos, conservados en todas las R. Es de notar que, esta región termina 18 aminoácidos antes que la subunidad RII, región a la que se le ha asignado un contacto importante en la unión de cAMP en R de mamíferos (Weber *et al*, 1987).

La región “bisagra” en Bcy1, es similar a RII, y presenta una secuencia inhibitoria RRTSV. La subunidad RII, posee un sitio de autofosforilación RRVSV, donde la autofosforilación de la Ser95 reduce la afinidad de R por C alrededor de 10 veces. Esta secuencia, en ausencia de cAMP, es la región principal (pero no la única) para la interacción con la subunidad catalítica. El rol de la autofosforilación de la subunidad regulatoria también se ha estudiado en otros organismos eucariotas inferiores como *Mucor rouxii* (Rossi *et al*, 1992) y *Candida albicans* (Zelada *et al*, 2002), donde se ha observado que la autofosforilación de R promueve una disminución de la afinidad R-C.

Se ha demostrado que Bcy1 es fosforilada *in vitro* por la subunidad catalítica heteróloga C $\alpha$  en el residuo Ser 145, aminoácido homólogo a la Ser 95 de RII. El reemplazo de Ser145 por Ala, anula la fosforilación *in vitro*, y provoca un incremento en la afinidad por la subunidad catalítica de 7-10 veces (Kuret *et al*, 1988).

No se conoce la función *in vivo* de la fosforilación en la Ser145. Se ha observado que en células en fase estacionaria de crecimiento, Bcy1 es modificada en varios residuos, donde se han identificado al menos cinco isoformas. La mutación en Ser145, anula la aparición de

algunas isoformas cuando las células están en fase estacionaria; lo que significa que la fosforilación de este residuo *in vivo* es necesaria para la acumulación de una o más isoformas de Bcy1 (Werner-Washburne *et al*, 1991).

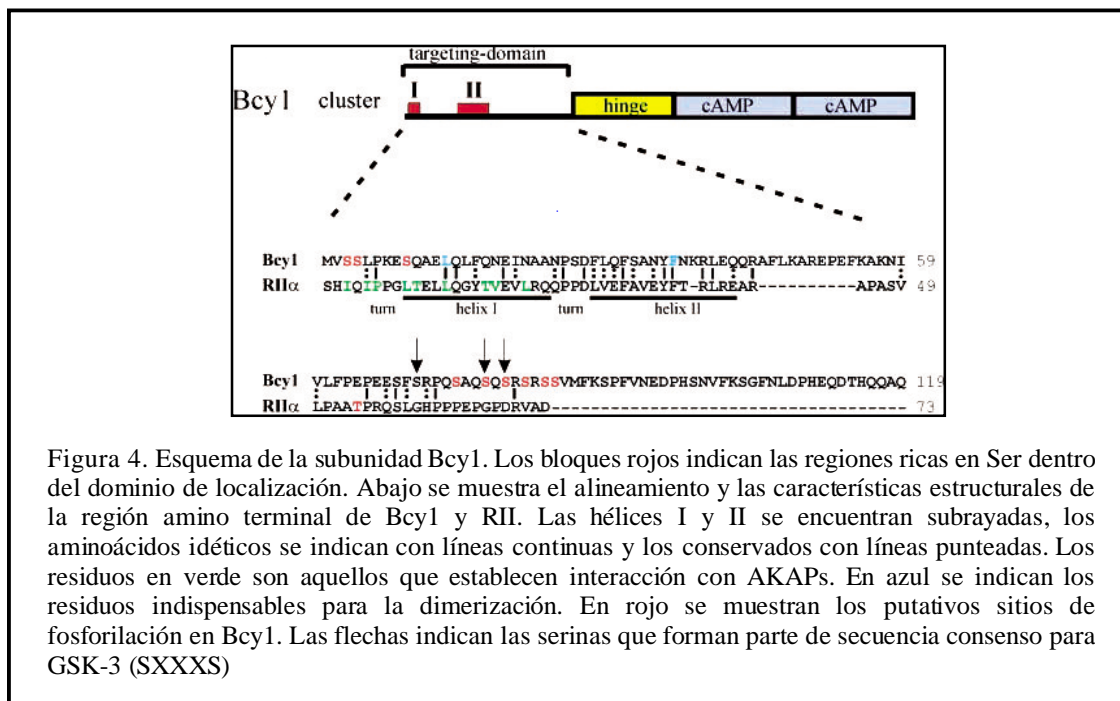
La delección de *BCY1*, resulta en un fenotipo similar al presente en cepas mutantes con actividad PKA elevada. En tales mutantes, existe una activación constitutiva de la glucólisis y una inactivación de la gluconeogénesis, resultando en una incapacidad de crecimiento en fuente de carbono no fermentable. Este fenotipo ha sido usado para aislar mutantes supresoras de la mutación *bcy1Δ* en células crecidas sobre glicerol. Los supresores aislados presentaron mutaciones que atenuaron la actividad catalítica de la PKA (Kikawa *et al*, 1987; Cameron *et al*, 1988). Estos alelos “débiles” en actividad quinasa (weak) de la subunidad catalítica se han aislado y caracterizado, los cuales han sido de mucha utilidad para estudiar los fenotipos dependientes de PKA y cAMP.

#### *Mecanismo molecular de la localización de la PKA.*

Además de la regulación vía cAMP que ejerce la subunidad regulatoria sobre la actividad catalítica, existe una modulación indirecta a través de la unión de la PKA a las proteínas de anclaje de la PKA (AKAPs). La mayoría de los miembros de la familia de AKAPs unen la subunidad R del tipo II, conociéndose pocos miembros que establezcan interacción con RI (Taskén y Aandahl, 2004).

A través de estudios por mutagénesis dirigida y NMR (Nuclear Magnetic Resonance), se tiene información detallada acerca de la estructura del dominio de dimerización de RII y su interacción con AKAPs. Cada monómero de RII se pliega en un motivo “turn-helix-turn-helix”. Residuos hidrofóbicos dentro de la hélice II y algunos residuos de la hélice I crean una superficie para la interacción entre ambos monómeros. Cuando se asocia como dímero cada monómero se dispone espacialmente en forma antiparalela, creando un motivo con forma de "X" formado por cuatro hélices. Así, en esta disposición ambas hélices I forman un sitio hidrofóbico de anclaje para la interacción con las AKAPs y esto explica el requerimiento de dimerización de las subunidades R para la interacción con las AKAPs (Scott *et al*, 1990).

El análisis comparativo entre las secuencias aminoacídicas de Bcy1 y RII (Figura 4) indica que los residuos dentro de la hélice I no se encuentran conservados en *S.cerevisiae*, mientras que sí se conservan los residuos de la hélice II y aquellos necesarios para la dimerización. Se ha demostrado que los residuos ubicados dentro de la hélice II son necesarios para una localización correcta de Bcy1 (Griffioen *et al*, 2000). Del análisis *in silico* de la región amino terminal de Bcy1 y RII se desprende que ambas proteínas presentan una estructura común pero los requerimientos para la localización parecen ser diferentes.



En pocos casos, se ha documentado que la localización de las subunidades R sea regulada por fosforilación en respuesta a señales intra o extra celulares. Un ejemplo en células de mamíferos es, la localización de RII a centrosomas y cromatina; durante la interfase, RII esta unido al centrosoma vía interacción con la AKAP450, pero en mitosis se disocia y se re-localiza por unión a la cromatina vía interacción con AKAP95. Esta localización dinámica de RII es regulada vía fosforilación por CDK1 (Landsverk *et al*, 2001).



La localización de la subunidad Bcy1, en levaduras, es dinámica y responde a cambios en la disponibilidad de nutrientes. Se requiere de la fosforilación de dos regiones ricas en serinas (clusters I y II, Figura 4) diferentes para su localización citoplasmática en ausencia de glucosa extracelular (Griffioen *et al*, 2001). Si bien la región amino terminal de Bcy1 posee una arquitectura similar a RII, no se han encontrado homólogos estructurales a las AKAPs en *S. cerevisiae*. Con la técnica de doble híbrido, usando el dominio amino terminal de Bcy1 como anzuelo se ha identificado la proteína Zds1. Se ha observado que la delección de Zds1 afecta la localización de la PKA, reduciendo su localización citoplasmática. Por el contrario, la sobreexpresión de Zds1 incrementa los niveles de Bcy1 en citoplasma (Griffioen *et al*, 2001). La fosforilación del cluster II de serinas, incrementaría su afinidad por Zds1, un posible homólogo funcional a las AKAPs de mamífero, y como consecuencia retendría a Bcy1 en el citoplasma. Además se ha observado que, la fosforilación del dominio amino terminal y localización de Bcy1 son dependientes de la expresión de *YAK1* (Griffioen *et al*, 2001; Werner-Washburne *et al*, 1991). Yak1 es una proteína quinasa, que se activa luego del consumo de glucosa. Es de notar que la expresión de Yak1 es controlada negativamente por PKA (Smith *et al*, 1998), sugiriendo que la propia PKA controla la localización de sus subunidades regulatorias.

Estudios *in vitro*, indicaron que RII puede ser fosforilada en la hélice II por la quinasa de la sintasa de glucógeno (GSK3) (Hemmings *et al*, 1982).

Además, la región amino terminal de Bcy1, específicamente en el “cluster” II posee varias secuencias consenso para GSK3 (Figura 4). Se ha observado que las levaduras mutantes *gsk3Δ*, presentan alteraciones en la fosforilación de Bcy1 y la localización subcelular de la subunidad regulatoria (Griffioen *et al*, 2003).

Aún no se conocen las consecuencias de la fosforilación sobre la estructura del dímero de subunidades regulatorias y/o sobre la superficie de unión a las AKAPs. Se especula que, la fosforilación de las subunidades Bcy1 y RII en regiones inmediatamente adyacentes a la hélice II, podría afectar su dimerización y su subsecuente interacción con AKAPs.

### *Localización de las subunidades catalíticas de la PKA*

Por definición, la subunidad catalítica de la holoenzima PKA colocaliza con los complejos R-AKAPs. Luego de la disociación de la holoenzima por cAMP, la localización de C no está restringida por la interacción con R, y se encontraría competente para fosforilar sustratos preferentemente cercanos. En células de mamíferos, la señalización nuclear vía cAMP requiere del movimiento de subunidades C libres dentro del núcleo (Mayr y Montminy, 2001). Por ejemplo, la translocación de C es el paso limitante para la fosforilación del factor de transcripción CREB. Ya que la entrada de C al núcleo es por difusión pasiva, la fosforilación de CREB es relativamente lenta (alcanza un máximo a los 30 minutos) comparada con la disociación por cAMP (ocurre aproximadamente en dos minutos) en el citoplasma (Hagiwara *et al*, 1993). Se piensa que el período necesario para la translocación nuclear de C podría contribuir a diferencias cinéticas en la fosforilación de sustratos citoplasmáticos y nucleares. A diferencia de la entrada, la salida del núcleo de C depende de un mecanismo de transporte activo. La inactivación y la exportación nuclear de C ocurren gracias a su interacción con el PKI (Protein Kinase Inhibitor); hecho que agregaría un punto de control sobre la accesibilidad de C a sustratos nucleares (Wen *et al*, 1995).

A diferencia de lo que ocurre en células de mamíferos, en presencia de glucosa como fuente de carbono, la PKA de *S. cerevisiae* se encuentra principalmente en el núcleo. La localización de Tpk1 (y posiblemente de Tpk2 y Tpk3) depende de la interacción con Bcy1, es decir depende de los niveles de cAMP.

En cambio, en células creciendo en fuente de carbono no fermentable o en fase estacionaria de crecimiento, Bcy1 se encuentra citoplasmática, donde puede inhibir a la subunidad catalítica, lo cual sería necesario para el metabolismo en fuente de carbono no fermentable (Griffioen *et al*, 2002).

En *S. cerevisiae* no se conoce si la exportación nuclear involucra un mecanismo activo. Un *análisis in silico* no ha revelado aún la presencia de un homólogo al PKI de mamíferos en el genoma de *S. cerevisiae*; sugiriendo que el mecanismo de exportación nuclear de la subunidad catalítica de PKA sería diferente del descrito para células de mamíferos.

### *Holoenzima PKA.*

En mamíferos existen cuatro isoformas principales de PKA: tipo I $\alpha$  y I $\beta$  (PKA del tipo I) y II $\alpha$  y II $\beta$  (PKA del tipo II), las cuales difieren respecto a sus subunidades R (RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$  y RII $\beta$ , respectivamente). Las diferentes isoformas presentan diferentes propiedades bioquímicas (Taskén *et al*, 1997) y funciones biológicas; por ejemplo, ratones que carecen del gen *RI $\alpha$*  mueren en el útero materno (Amieux *et al*, 2002), mientras que ratones que carecen del gen *RII $\beta$*  son viables, delgados y poseen disfunciones nutricionales (Cummings *et al*, 1996). Cada subunidad regulatoria presenta diferentes afinidades por el cAMP, generando holoenzimas con diferentes umbrales de activación. Las PKA de tipo II presentan una constante de activación ( $K_{act}$ ) de 200-400 nM por el cAMP, mientras que las de tipo I poseen mayor afinidad, presentando una constante de activación ( $K_{act}$ ) de 50-100 nM por el cAMP (Dostmann *et al*, 1991). Además, las isoformas de R se expresan diferencialmente en diversas células y tejidos, siendo capaces de formar homo y hetero dímeros generando un gran número de combinaciones, las cuales pueden contribuir a la diversidad y especificidad de la vía del cAMP. La localización subcelular de la PKA se debe principalmente a la interacción de las subunidades regulatorias con las AKAPs. Mientras que las PKA del tipo I se las conoce como solubles, lo que llevó a asumir que éstas son principalmente citoplasmáticas, las PKA del tipo II son particuladas por encontrarse confinadas a distintas estructuras subcelulares a través de la interacción con AKAPs, las cuales a su vez son expresadas específicamente en diferentes tejidos y células. Sin embargo, se han descrito algunas AKAPs duales, las cuales anclan simultáneamente PKA del tipo I y del tipo II, así como AKAPs que selectivamente anclan PKA del tipo I (Li *et al*, 2001 y Hamuro *et al*, 2002).

### *Estructura cuaternaria de la holoenzima.*

Hasta el momento, la conformación precisa de la estructura de la holoenzima es solo un modelo especulativo, ya que no se ha podido cristalizar el heterodímero RC. Sin embargo, la combinación de abordajes experimentales que permiten obtener información detallada acerca de la estructura de dominios individuales y estudios de mutación de residuos sobre ambas subunidades, se han utilizado para arribar a modelos que describen los cambios

estructurales que se producen sobre ambas subunidades durante su asociación y disociación. A continuación se detallan las principales observaciones que se desprenden de estos estudios (Zhao *et al*, 1998; Tung *et al*, 2002; Heller *et al*, 2004):

*Subunidad catalítica:*

\*La unión del fragmento PKI(5-22) a la subunidad C produce un cambio desde una conformación abierta a una cerrada del bolsillo catalítico. La conformación de C, formando parte de los complejos  $\Delta^{1-91}\text{RIC}\alpha$  o C-PKI, resultó idéntica por lo que se concluye que el posicionamiento del sitio de pseudosustrato en el bolsillo catalítico de C produce un cambio conformacional de éste similar al PKI.

*Subunidad regulatoria:*

\* Utilizando  $\Delta^{1-91}\text{RI}$  monómero se ha observado que la unión del cAMP no induce cambios conformacionales en la estructura de R, como por ejemplo, cambios en la posición relativa de los dominios de unión al cAMP. No se ha podido realizar este tipo de análisis sobre  $\text{R}_2$  (dímero) ya que las preparaciones de proteínas presentaban un alto grado de agregación. Por lo tanto, se especula que, la activación de la holoenzima debe ser consecuencia de cambios estructurales pequeños y localizados promovidos por la unión del cAMP a R.

\*La comparación de la estructura cristalina de  $\Delta^{1-91}\text{RI}$  y  $\Delta^{1-111}\text{RII}$  indicó que la estructura de cada sitio de unión a cAMP es similar pero la orientación entre ambos sitios en  $\Delta^{1-91}\text{RI}$  difiere de lo observado en  $\Delta^{1-111}\text{RII}$ , indicando una estructura mas compacta en RII.

*Holoenzima.*

La inhibición de C por la unión de R involucra cambios significativos en R, específicamente dentro de la región linker. Por el contrario, la activación de la holoenzima es un proceso de varios pasos que involucran no solamente cambios conformacionales en los sitios de unión del cAMP, sino también cambios en la región linker de RI que impactan en la estructura global de  $\text{R}_2$ .

\*La holoenzima posee una conformación extendida con forma de “Y”, donde los dominios de dimerización forman la región central, y la secuencia autoinhibitoria y los dominios de unión al cAMP de R en asociación con C forman cada lóbulo. En la holoenzima las dos subunidades C están separadas una de otra. Cada subunidad R interacciona con una sola subunidad C. La superficie de interacción entre R y C es relativamente pequeña favoreciendo la disociación de las subunidades.

\*La alta afinidad de unión entre R y C está mediada por al menos dos sitios de interacción espacialmente distintos. El sitio primario de interacción esta mediado por el sitio de pseudosustrato en la región linker de R que llena el sitio activo de C. Un sitio secundario de interacción, llamado periférico, está formado por residuos del dominio A de unión al cAMP, los cuales forman una estructura  $\alpha$ -hélice. Ambos sitios interaccionan con C con baja afinidad, pero ambos contribuyen a la alta afinidad del complejo R-C (Kd: 0.2 nM) (Figura 5, B).

\*La fosforilación de la Thr197 (residuo que pertenece al loop de activación) no solo es importante para la catálisis, sino también para el re-arreglo de los sitios de unión primarios y secundarios con R.

\*Experimentos de mayor resolución, empleando RI, han demostrado que la unión del cAMP al sito A causa un cambio en la accesibilidad al solvente en la región  $\alpha$ -hélice que interacciona con C sin cambio aparente en la región linker.

\*Los resultados indican que la región bisagra de R debe sufrir un cambio conformacional importante por la unión de C, ya que permite el contacto simultaneo entre el sitio de unión del cAMP de R con C y la secuencia del pseudosustrato con el bolsillo catalítico de C.

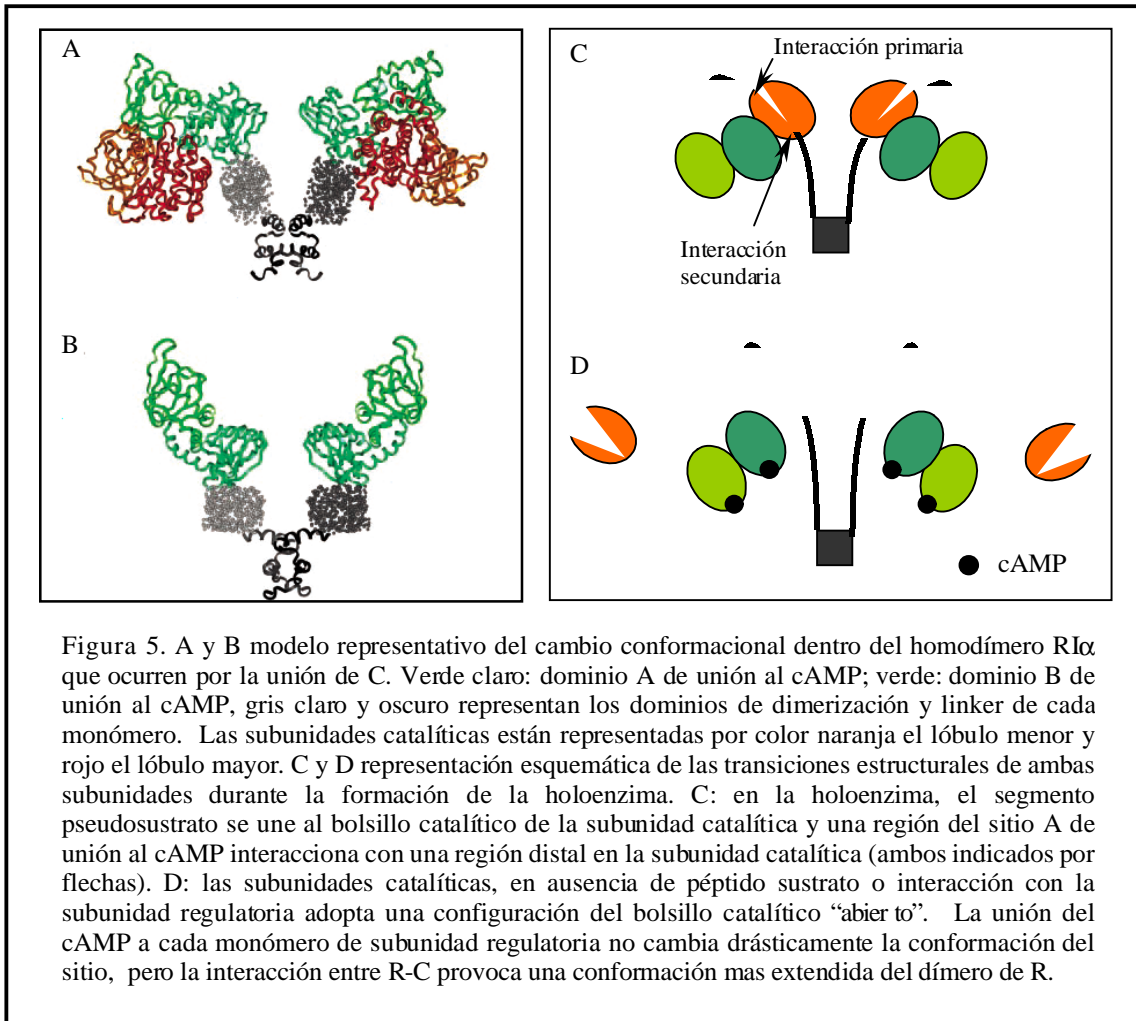
\*Debido a la conformación extendida que adopta la región del pseudosustrato en el bolsillo catalítico de C, se produciría un cambio conformacional adicional en otros puntos de la región bisagra que afecten la orientación relativa de los distintos dominios del homodímero, por lo que la subunidad R presenta una conformación mas extendida cuando se une a C.

\*La conformación adoptada por los dominios de dimerización de R en la holoenzima promovería la formación del dominio necesario para la interacción con AKAPs.

\*Los sitios de unión al cAMP se encuentran accesibles al solvente que los rodea, permitiendo el fácil acceso del cAMP intracelular.

\*La comparación entre las holoenzimas formadas por RI y RII demuestran que la diferencia en la región bisagra que presentan ambos tipos de subunidad R tiene un profundo impacto sobre la estructura global de las holoenzimas.

\*La estructura de la holoenzima de tipo II es mas extendida que la holoenzima del tipo I.



*Holoenzima de Saccharomyces cerevisiae.*

La cinética de la interacción R-C en *S. cerevisiae* difiere de la interacción entre subunidades en mamíferos. En mamíferos, la interacción de ambos tipos de R es

aproximadamente similar, en el rango subnanomolar; en *S. cerevisiae*, se ha estimado que la afinidad se encuentra alrededor de 20 nM (Kuret *et al*, 1988).

Se ha estimado para holoenzimas de mamíferos, que el cAMP decrece la afinidad R-C 1000 veces (Koperud *et al*, 2002). En *S. cerevisiae*, la afinidad aparente entre R-C disminuye sólo 20 veces por el agregado de cAMP. Las razones para estas desigualdades pueden radicar en las diferencias en la estructura primaria de las subunidades regulatorias Bcy1 y RII, y en las diferentes modificaciones postraduccionales que sufren cada una, las cuales han sido descritas anteriormente. Además, es importante destacar que la subunidad C de *S.cerevisiae* difiere de su homóloga en mamíferos en cuanto a la afinidad por el kemptido (Tpk1 es 20-30 veces menos afín) y por PKI (Tpk1 es inhibida con baja potencia) (Zoller *et al*, 1988).

#### *Mecanismo de activación de la holoenzima PKA.*

La dilucidación del mecanismo general de activación de la holoenzima por el cAMP tiene importantes consecuencias en la biología celular, especialmente a partir de la importancia de los aspectos temporales y espaciales que regulan la transducción de señales. La pregunta de si la holoenzima es disociada sólo por el cAMP surge como consecuencia del conocimiento de la función de la localización de la señalización de la PKA por las AKAPs. No hay duda que la unión del cAMP disminuye la afinidad entre R y C, pero aún no se conoce cómo ocurre este proceso y si es suficiente para producir la disociación bajo condiciones de equilibrio similares a los encontrados en la célula.

Se ha estimado que la concentración de la PKA, asumiendo que la proteína se distribuye en un 70% del espacio intracelular, es aproximadamente 1.2  $\mu$ M en tejido cerebral (Hofmann *et al*, 1977), igualmente éstos valores podrían ser mucho mayores en los microdominios localizados de PKA.

El mecanismo de activación involucra la formación de una holoenzima inactiva a bajas concentraciones de cAMP, pero a altas concentraciones las subunidades se disocian en un homodímero de R y dos C activas (Figura 1). Este modelo, ha sido sustentado por varios experimentos *in vitro* pero bajo condiciones de no-equilibrio y utilizando concentraciones

de enzima en el rango subnanomolar. Recientemente, han surgido evidencias que permiten reconsiderar este mecanismo.

Experimentos utilizando técnicas como por ejemplo, FRET (fluorescence resonance energy transfer), realizadas en condiciones de equilibrio, indicaron que no es suficiente la presencia de altas concentraciones de cAMP para disociar la holoenzima de tipo II (Johnson *et al*, 1993 y Yang *et al*, 1995).

Aún *in vitro*, se han aislado complejos ternarios  $R_2C_2cAMP$  en *Mucor rouxii* (Moreno *et al*, 1983). En un estudio reciente (Døskeland *et al*, 2002), se ha sugerido que las holoenzimas, tanto del tipo I como las del tipo II, son relativamente estables en presencia de cAMP, bajo condiciones de equilibrio. Además, han observado que el sustrato podría desestabilizar el complejo  $R_2C_2cAMP_4$ .

Vigil *et al*, 2004, han utilizado el método SAXS (small-angle X-ray scattering) para investigar el mecanismo de disociación de la PKA tanto del tipo I como II. Éste método detecta cambios en la asociación entre proteínas, en este caso R y C, sin emplear métodos que modifiquen la estructura de cada subunidad (por ejemplo, agregado de marcas fluorescentes). Utilizando altas concentraciones de enzima (del orden  $\mu M$ ) han determinado el grado de asociación de la PKA en presencia de un exceso de cAMP con o sin kemptido como sustrato, o en presencia del sustrato solo. El kemptido es un heptapéptido sintético derivado de la protaína quinasa de hígado porcino y su secuencia es LRRASLG, éste resultó ser un excelente sustrato y ahora sirve como sustrato universal para determinar actividad de la PKA.

Han observado que mientras el agregado de un exceso molar de cAMP a la holoenzima tipo I sólo causó una disociación parcial, el agregado del sustrato peptídico mas cAMP provocó la disociación completa. De manera similar, el agregado de un exceso de cAMP a la holoenzima de tipo II solo causó una disociación parcial de la holoenzima, y el agregado del sustrato peptídico provocó un incremento de la disociación, pero en menor grado que para PKA tipo I, manteniendo un porcentaje significativo de holoenzima PKA tipo II sin disociar. Estos resultados confirmaron que la holoenzima es estable en presencia de cAMP y, más interesante aún, que el sustrato juega un rol diferencial en el proceso de activación de las holoenzimas del tipo I y II.



Sobre la base de estos resultados y la observación de que el agregado de cAMP a RI afecta directamente la conformación o accesibilidad de la región  $\alpha$  hélice en el dominio A de unión al cAMP, se ha propuesto un mecanismo de activación donde tanto el cAMP como el sustrato ejercen un rol durante este proceso. La unión del cAMP a RI provocaría un cambio conformacional en el subdominio del sitio A de unión al cAMP que interactúa con C (Figura 5, flecha que indica la interacción secundaria), debilitando dicha interacción. Si el sustrato está presente, éste compite con el sitio de pseudosustrato y facilita la disociación completa de la holoenzima. El hecho que el sustrato, en ausencia de cAMP, no promueve la disociación de las subunidades indicaría que el sitio catalítico se encuentra completamente bloqueado en la holoenzima. Sin embargo, la unión del cAMP a la holoenzima causaría cambios conformacionales que permitiría al sustrato competir con la secuencia de pseudosustrato por el bolsillo catalítico de la subunidad C.

#### *Microdominios de cAMP.*

Actualmente, han surgido varias líneas de evidencias que indican la existencia de “restricciones de difusión de segundos mensajeros”, las cuales generarían la compartimentalización química. Esto ha cobrado relevancia en la señalización vía cAMP, ya que se han descrito dominios o “pools” de cAMP en retículo endoplásmico de cardiomiocitos (Rich *et al*, 2000) y en neuronas (Scriven *et al*, 2000).

Diferentes ligandos, a través de la unión a receptores acoplados a proteínas G, pueden cambiar positivamente o negativamente los niveles de cAMP por actuar vía proteínas G estimuladoras o inhibitorias de la adenilato ciclasa. Se presumen que los dominios de cAMP generados en respuesta a ligandos específicos son determinados por la localización y disponibilidad espacial de receptores y adenilato ciclasas. Además, los microdominios de cAMP son “modificados o limitados espacialmente” por fosfodiesterasas (PDE) (Figura 6).

Es factible que los gradientes de cAMP generados por distintos ligandos sean organizados específicamente para seguir una ruta particular de señalización vía PKA; a través de la activación de varios o al menos un complejo PKA-AKAP. De manera similar a los

dominios de cAMP, los picos y los gradientes de  $\text{Ca}^{2+}$  son generados y determinados por la liberación y captación controlada del catión.

La distribución de diversas PDEs en diferentes compartimentos subcelulares se ha propuesto en un principio por la observación de que la actividad fosfodiesterasa se aisló tanto en fracciones solubles como en fracciones particuladas de la célula. Por ejemplo, en cardiomiocitos, se ha descrito una AKAP que ancla PDE4D3 y PKA tipo II a una región perinuclear (Dodge *et al*, 2001).

Este es el primer ejemplo de complejos PKA/PDE que generan un control espacial de la señal PKA, tanto por su anclaje a través de AKAPs como por el control temporal de la señalización a través de localizar cerca a PDE. Además, PDE4D3 es activada por fosforilación vía PKA, estableciendo una vía de regulación negativa, que termina con la señal local de cAMP.

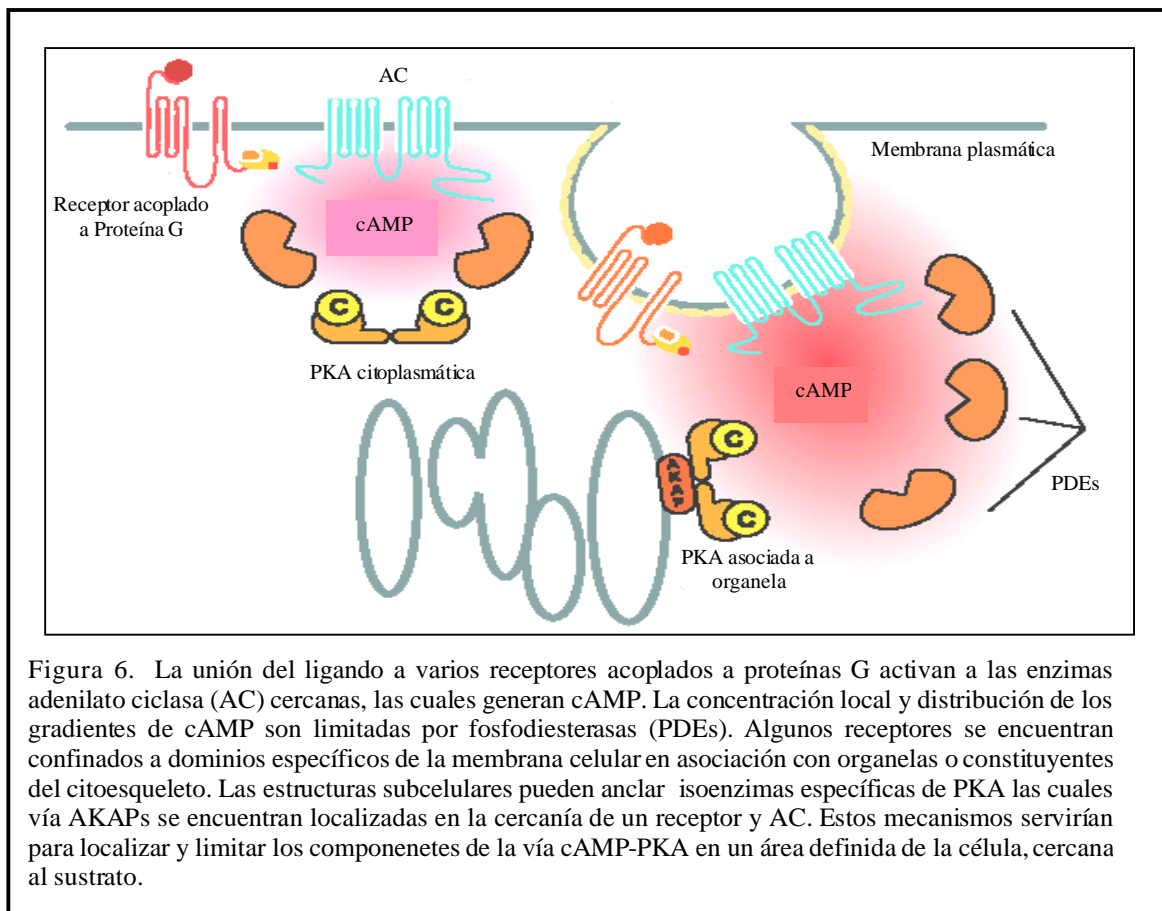


Figura 6. La unión del ligando a varios receptores acoplados a proteínas G activan a las enzimas adenilato ciclasa (AC) cercanas, las cuales generan cAMP. La concentración local y distribución de los gradientes de cAMP son limitadas por fosfodiesterasas (PDEs). Algunos receptores se encuentran confinados a dominios específicos de la membrana celular en asociación con organelos o constituyentes del citoesqueleto. Las estructuras subcelulares pueden anclar isoenzimas específicas de PKA las cuales vía AKAPs se encuentran localizadas en la cercanía de un receptor y AC. Estos mecanismos servirían para localizar y limitar los componentes de la vía cAMP-PKA en un área definida de la célula, cercana al sustrato.

La hipótesis de los dominios de cAMP que se formula, permite explicar resultados experimentales obtenidos en cardiomiocitos. En estas células, los efectos del tratamiento con isoproterenol correlacionan con la activación de una fracción de PKA asociada a membrana, mientras que el incremento de cAMP evocado por prostaglandina E<sub>1</sub> es principalmente en citoplasma sin consecuencias funcionales (Hayes *et al*, 1980).

#### *Sustratos de la PKA.*

##### *Determinantes de la especificidad de la proteínas quinasas.*

Las proteínas quinasas, en general, son responsables de la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos a través de la fosforilación de distintas proteínas funcionalmente y/o estructuralmente diferentes. Por esto, la selectividad del proceso bioquímico mediado por fosforilación de proteínas debería depender en gran medida de la precisión del reconocimiento molecular de las proteínas blanco por parte de las proteínas quinasas.

La "especificidad de sustrato" de las proteínas quinasas está determinada esencialmente por la naturaleza química del sitio de fosforilación y la estructura de la proteína alrededor del residuo fosforilable, y se puede disgregar en diferentes factores:

- a) la especificidad del sitio (residuo) de las enzimas determina el tipo de residuo fosfoaceptor.
- b) la estructura primaria de la proteína alrededor del sitio fosforilable describe la especificidad de secuencia de la proteína quinasa en términos de "motivos de secuencia consenso". Por definición la secuencia consenso refiere a elementos de la estructura primaria presentes en todos los sustratos de una quinasa en particular.
- c) reconocimiento de elementos estructurales secundarios y terciarios en la proteína blanco por parte de la proteína quinasa.
- d) localización subcelular de la proteína quinasa relativa al sustrato.

##### *Sustratos fisiológicos de la PKA.*

Las bases moleculares de la especificidad de sustratos de la PKA han sido originalmente bien definidas a través de la determinación de actividad quinasa utilizando: péptidos sustratos derivados de proteínas sustratos bien caracterizadas y péptidos derivados del PKI;

determinantes de unión claves tanto en el PKI como en la subunidad catalítica derivados de la estructura cristalina del complejo PKI-C; cambios estructurales en la subunidad catalítica bajo la unión del PKI. Por ejemplo, empleando kemptido (LRRASLG) se ha observado *in vitro* que, sustituciones que alejan o acercan el par de R respecto del sitio fosfoaceptor o la sustitución de éstos por K afectan su calidad como sustratos de la PKA, disminuyendo la constante de especificidad de la catálisis hasta 700 veces (Walsh *et al*, 1994). Estos resultados indicarían que los sustratos nativos deberían conservar una secuencia específica "mínima" que asegure propiedades cinéticas óptimas para su fosforilación.

De los estudios de la estructura cristalina del complejo PKI-C, se demostró que la mayoría de los sitios de unión del PKI están ubicados en el lóbulo menor de la subunidad C (Figura 2). Existen residuos ácidos (indicados entre paréntesis) en la subunidad catalítica que son importantes para hacer contacto de tipo electroestático con las argininas P-2 (Glu230 y Glu170), P-3 (Glu127 y un conjunto de interacciones que incluyen un OH<sup>-</sup> de la ribosa del ATP) y P-6 (Glu203) del PKI. También se han identificado un conjunto de interacciones no electroestáticas, residuos hidrofóbicos en la posición P+1 y P-11 del PKI establecen interacción dos bolsillos hidrofóbicos formados por Leu205/Leu198/Pro202 y Phe239/Arg133/Tyr235 respectivamente (Knignton *et al*, 1991).

Sin embargo, se han descrito sustratos naturales de la PKA que presentan sustituciones en las argininas P-2 y P-3 por lisinas o variaciones en la posición relativa de éstas respecto al residuo fosfoaceptor. Esto indica que los sustratos "naturales" de la PKA se desvían de la descripción de especificidad obtenida *in vitro*, por lo que se necesitaría realizar un análisis de los sustratos fisiológicos con el objetivo de conocer que características presentan éstos dentro de las secuencias consenso de fosforilación. Con el uso de técnicas de biología molecular y mejores técnicas de secuenciación se ha avanzado en la identificación de sitios de fosforilación fisiológicamente relevantes.

Los criterios generales para la selección de un sustrato fisiológico de las proteínas quinasas han sido expuestos por Krebs y Beavo (1979):

- 1) Demostración *in vitro* que la enzima puede ser estequiométricamente fosforilada por una quinasa apropiada y defosforilada por una fosfatasa apropiada.

- 2) Demostración que las propiedades de la enzima sufren cambios que correlacionan con el grado de fosforilación.
- 3) Demostración que la enzima puede ser fosforilada y defosforilada *in vivo* o en un sistema celular intacto acompañado de cambios funcionales.
- 4) Correlación entre los niveles de proteína quinasa y/o fosfatasa y el grado de fosforilación de la enzima.

Recientemente, (Shabb, 2001) se ha elaborado una lista de aproximadamente 100 sustratos fisiológicos de la PKA. Para esto, basándose en los criterios expuestos anteriormente, se incluyeron los sustratos en los cuales se ha demostrado la fosforilación *in situ* en respuesta al incremento del cAMP (puntos 3 y 4), mas la precisión que ofrece la identificación del sitio de fosforilación *in vivo*. Esto es importante, ya que no es raro que los sitios *in vitro* e *in vivo* difieran. No todos los sustratos incluidos en la lista, pueden cumplir con los cuatro puntos. Varios sustratos que se han incluido no presentan una consecuencia funcional de su fosforilación. Algunos de ellos pueden incluir efectos que aún no han sido considerados como localización subcelular o tasa de degradación en células intactas. Para algunos de los sustratos recientemente identificados por otro lado, no se han caracterizado las propiedades de su fosforilación *in vitro*.

#### *Sitio consenso de fosforilación de la PKA.*

Los sitios de fosforilación obtenidos a partir de la recopilación realizada por Shabb (2001) permite la evaluación de la secuencia consenso para PKA en un contexto fisiológico. La observación de que clase de residuos y la posición relativa de éstos al aminoácido fosfoceptor de todos los sitios de fosforilación, demuestra que no existe una secuencia consenso única que prediga satisfactoriamente los sitios de fosforilación. Por lo que se requiere de la confirmación experimental de los sitios de fosforilación de la PKA.

Analizando la probabilidad de fosforilación por PKA (número que representa la eficiencia del motivo consenso de PKA de ser fosforilado) como el cociente entre los sitios fosforilados determinados experimentalmente sobre los sitios consensos totales (el número total de sitios se obtiene al buscar cada fórmula consenso, por ejemplo RRXS, en el conjunto de sustratos fisiológicos recopilados) se ha observado que:

- 1) Existe una fuerte preferencia por R (Arginina) en P-2 y/o P-3 (relativo al residuo fosforilable P0).
- 2) La secuencia consenso RRXS es la mas abundante, representando ligeramente mas del 50% de todos los sitios. Este motivo resultó ser el mas eficiente sustrato de PKA, ya que el 80% de todos los sitios RRXS presentes en los sustratos fisiológicos están sujetos a fosforilación.
- 3) Si bien la R es el residuo básico preferido en las posiciones P-2 y P-3, aproximadamente el 15% contiene al menos un residuo K (Lisina) en estas posiciones. El 47% de todos los sitios RKXS son fosforilados en sustratos fisiológicos por PKA, mientras que la eficiencia de fosforilación es menos del 20% para KRXS.
- 4) El residuo Ser es preferido como sitio fosfoaceptor frente a la Thr, la presencia de Ser ocurre en 135 de 145 secuencias examinadas.

Examinando las posiciones fuera de P-2 y P-3 surgen otras preferencias. Existe una leve preferencia por R en las posiciones P-4 a P-7 y una gran frecuencia de residuos hidrofóbicos (Phe, Ile, Leu y Val) en la posición P+1. Existe además un incremento en la frecuencia de residuos pequeños en la posición P-1.

De estas observaciones se desprende que la PKA fosforila eficientemente sustratos fisiológicos que presenten secuencias consenso RRXS, lo cual es consistente con numerosos estudios *in vitro* así como el análisis bioquímico y cristalográfico de las interacciones entre PKI y PKA. Pero este motivo representa solo el 50% de todos los sitios fisiológicos de la PKA. La fosforilación, menos frecuente, de motivos con variaciones tanto en la posición como en el tipo de residuo dificulta la predicción de sitios de fosforilación sobre la base de la estructura primaria. Es importante notar que la flexibilidad en la secuencia consenso podría causar que diferentes sustratos presenten diferentes afinidades por la subunidad catalítica, constituyéndose en "mejores" y "peores" sustratos.

#### *Estructura secundaria y exposición a la superficie de los sitios de fosforilación.*

Se ha analizado la estructura secundaria de péptidos derivados de 406 sustratos proteicos para proteínas quinasas. Se ha observado que, utilizando varios métodos de predicción, los residuos Ser y Thr se encuentran preferentemente dentro de estructuras del tipo "coil"

(70%), mientras que en el 20-30% de las secuencias se predice que se encontrarían en estructuras del tipo hélice o extendidas (Kreegipuu *et al*, 1998).

El mismo conjunto de datos se utilizó para la predicción de la accesibilidad a la superficie de los residuos Ser y Thr presentes en los sustratos. Alrededor del 65-70% de los residuos fosforilables se predicen en la superficie de la proteína. Por otro lado, si se realiza este análisis sobre todos los residuos Ser y Thr de las proteínas sustratos se observa que la Ser y Thr tienen la misma probabilidad de tener ubicaciones externas o internas en la proteína.

Estos resultados indicarían que el residuo a ser fosforilado debe encontrarse en la superficie de la proteína sustrato, accesible a la proteína quinasa y ser parte de una cadena polipeptídica relativamente flexible para "adaptarse" al sitio activo de la enzima.

No existe mucha evidencia experimental que describa el efecto de las características estructurales del sitio consenso sobre la fosforilación por la PKA.

La tasa de fosforilación de la piruvato quinasa de hígado de cerdo resultó menor que para un péptido derivado de ésta (Humble *et al*, 1975).

El péptido sintético mas corto, derivado del PKI, que conserva alta potencia de inhibición de la actividad catalítica es el PKI(6-22), donde los residuos R<sup>18</sup>RNAI<sup>22</sup> comprenden la región de pseudosustrato. Se observó utilizando análogos estructurales del PKI(6-22), que la estructura de la porción central del péptido, comprendida por los residuos 12-15, tiene gran influencia sobre su habilidad para unirse a la subunidad catalítica e inhibirla. Específicamente, la formación de una estructura del tipo lámina  $\beta$  en la región central disminuye la interacción PKI-subunidad catalítica (Glass *et al*, 1995).

#### *Co-localización de la PKA con sustratos fisiológicos.*

El uso de péptidos que compiten la interacción AKAPs-dominio de dimerización de las subunidades regulatorias de la PKA ha permitido demostrar el rol de las proteínas de anclaje de la PKA en las reacciones de fosforilación. Se ha diseñado el péptido Ht31, el cual compite con la AKAPs por la unión al dominio de dimerización de las subunidades regulatorias. Cuando el péptido Ht31 es introducido en una célula, puede bloquear la fosforilación dependiente de cAMP de un sustrato si la AKAP esta involucrada en la co-localización de la PKA y éste (Carr *et al*, 1993).

Esta técnica ha permitido el hallazgo de varios sustratos cuya fosforilación depende de la co-localización; algunos ejemplos son: Acuoporina-2, receptor  $\beta_2$ -adrenérgico, canales de calcio sensibles a voltaje, etc.

Sin embargo, se han descrito algunos casos en donde la subunidad catalítica interacciona directamente con el sustrato, como ser la propia subunidad regulatoria del tipo II, el factor nuclear  $\kappa B$ , etc.

#### *Especificidad de sustrato de la PKA de S.cerevisiae.*

El activador transcripcional Adr1 es necesario para la expresión de la enzima alcohol deshidrogenasa y ha sido descrito como sustrato de la PKA (Cherry *et al*, 1989). Utilizando péptidos derivados de Adr1 se ha caracterizado la especificidad de sustrato de la PKA de *S. cerevisiae*. Se emplearon péptidos de diferentes largos alrededor de la Ser230, y como fuente de subunidad catalítica, a modo de comparación, la isoforma Tpk1 y la subunidad catalítica de la PKA de corazón porcino. Ambas PKA fosforilan el péptido sintético ADR1217-234 con mayor afinidad que el kemptido.

Ambas subunidades catalíticas presentan determinantes aminoacídicos en común, los cuales incluyen los residuos proximales del lado amino terminal y hasta la posición P+4 del carboxilo terminal respecto del sitio fosfoaceptor. La enzima de mamíferos, sin embargo, presenta mayor afinidad por los sustratos que Tpk1. Además, ambas subunidades catalíticas presentan diferencias cuantitativas en sus preferencias por péptidos sustratos particulares: la enzima de mamíferos prefiere péptidos mas largos respecto de la posición P-4. Estos resultados sugieren que las subunidades catalíticas reconocen determinantes aminoacídicos similares pero no idénticos.

#### *Transducción de señales vía cAMP-PKA en S.cerevisiae.*

##### *Glucosa y señalización por cAMP.*

La glucosa es un nutriente ubicuo, el cual sirve como fuente de carbono y energía para diversos organismos. Con el objetivo de adaptar el metabolismo, los organismos han desarrollado diferentes mecanismos de señalización y detección de la glucosa. En plantas, la presencia de glucosa permite activar un importante sistema de transducción de señales el



cual apaga la fotosíntesis en presencia de cantidades suficientes de glucosa (Smeekens and Rook, 1997). En mamíferos, la detección de azúcar en sangre por las células  $\beta$  del páncreas es importante para regular los niveles de insulina, la cual a su vez estimula al tejido adiposo y muscular a captar glucosa desde la sangre (Efrat *et al*, 1994).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo eucariote unicelular, que preferentemente fermenta glucosa como fuente de energía y carbono. Células de levadura creciendo en presencia de azúcares fermentables, como glucosa, fructosa o manosa, exhiben características muy diferentes en comparación con células creciendo en fuente de carbono no fermentable como glicerol o etanol. Las células en presencia de glucosa, por ejemplo, poseen poca actividad respiratoria y gluconeogénica, presentan una glicólisis activa, crecen más rápido que las células que no están fermentando, son sensibles a diferentes condiciones de estrés ambiental y acumulan bajos niveles de trehalosa y glucógeno. Las células creciendo en fuente de carbono no fermentable, como glicerol, poseen características opuestas.

Dos de las vías mejor descritas que señalizan la presencia de glucosa, y contribuyen a mantener las características fermentativas son: la vía principal de represión por glucosa y la vía del cAMP (Figura 7).

La vía principal de represión por glucosa reprime la transcripción de genes respiratorios y gluconeogénicos, y además genes que codifican para enzimas involucradas en la utilización de fuentes de carbono alternativas, como galactosa, sacarosa o manosa. La activación de la vía del cAMP por glucosa produce un incremento transiente de los niveles de cAMP intracelulares, los cuales a su vez activan a la PKA.

La PKA controla un amplio conjunto de proteínas blanco, tanto a nivel transcripcional o por fosforilación directa, que resulta en una estimulación de la glicólisis, inhibición de la gluconeogénesis, progresión a través del ciclo celular, inducción de genes de crecimiento, represión de los genes relacionados con la resistencia al estrés y degradación de los carbohidratos glucógeno y trehalosa (Thevelein, 1994).

Tanto para células eucariotas como procariontes el cAMP juega un rol clave en el camino de transducción de señales. La enzima adenilato ciclasa cataliza su síntesis a partir de ATP. En levaduras, existen dos vías de señalización diferentes pero interdependientes que controlan

y regulan la actividad de la adenilato ciclasa: Sistema de receptor acoplado a una proteína G y las proteínas monoméricas con actividad GTPasas, Ras1 y Ras2.

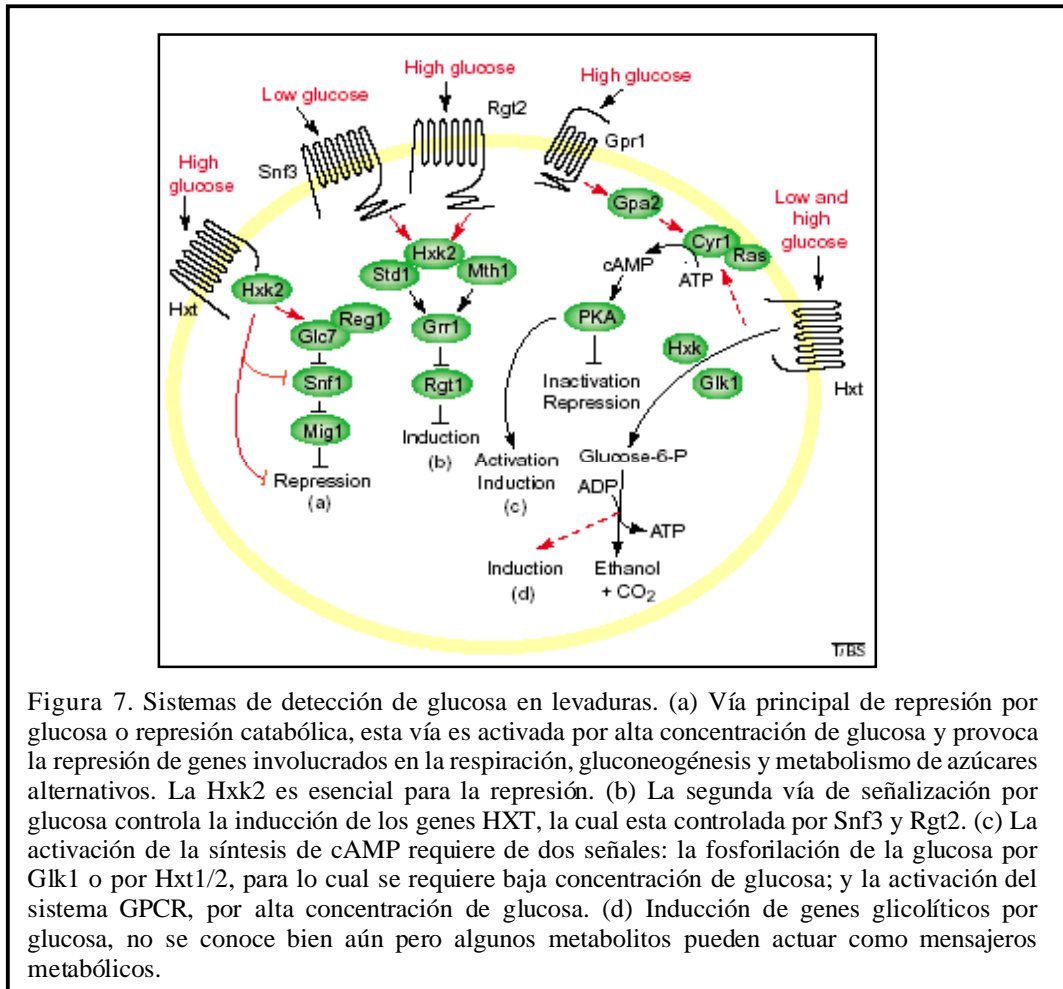


Figura 7. Sistemas de detección de glucosa en levaduras. (a) Vía principal de represión por glucosa o represión catabólica, esta vía es activada por alta concentración de glucosa y provoca la represión de genes involucrados en la respiración, gluconeogénesis y metabolismo de azúcares alternativos. La Hxk2 es esencial para la represión. (b) La segunda vía de señalización por glucosa controla la inducción de los genes HXT, la cual esta controlada por Snf3 y Rgt2. (c) La activación de la síntesis de cAMP requiere de dos señales: la fosforilación de la glucosa por Glk1 o por Hxt1/2, para lo cual se requiere baja concentración de glucosa; y la activación del sistema GPCR, por alta concentración de glucosa. (d) Inducción de genes glicolíticos por glucosa, no se conoce bien aún pero algunos metabolitos pueden actuar como mensajeros metabólicos.

### Vía principal de represión por glucosa.

Las células de levaduras detectan la presencia de glucosa en el medio extracelular por diferentes vías. Para la activación de la vía principal de represión por glucosa, se requiere la fosforilación de la glucosa pero no su posterior metabolismo. La fosforilación de la glucosa es catalizada por tres quinasas: hexoquinasa 1 y 2 (Hxk1 y 2) y glucoquinasa (Glk1).

Para una respuesta inmediata es suficiente la presencia de cualquier enzima hexoquinasa (Hxk1, Hxk2 o Glk1); en cambio la represión por glucosa requiere específicamente Hxk2

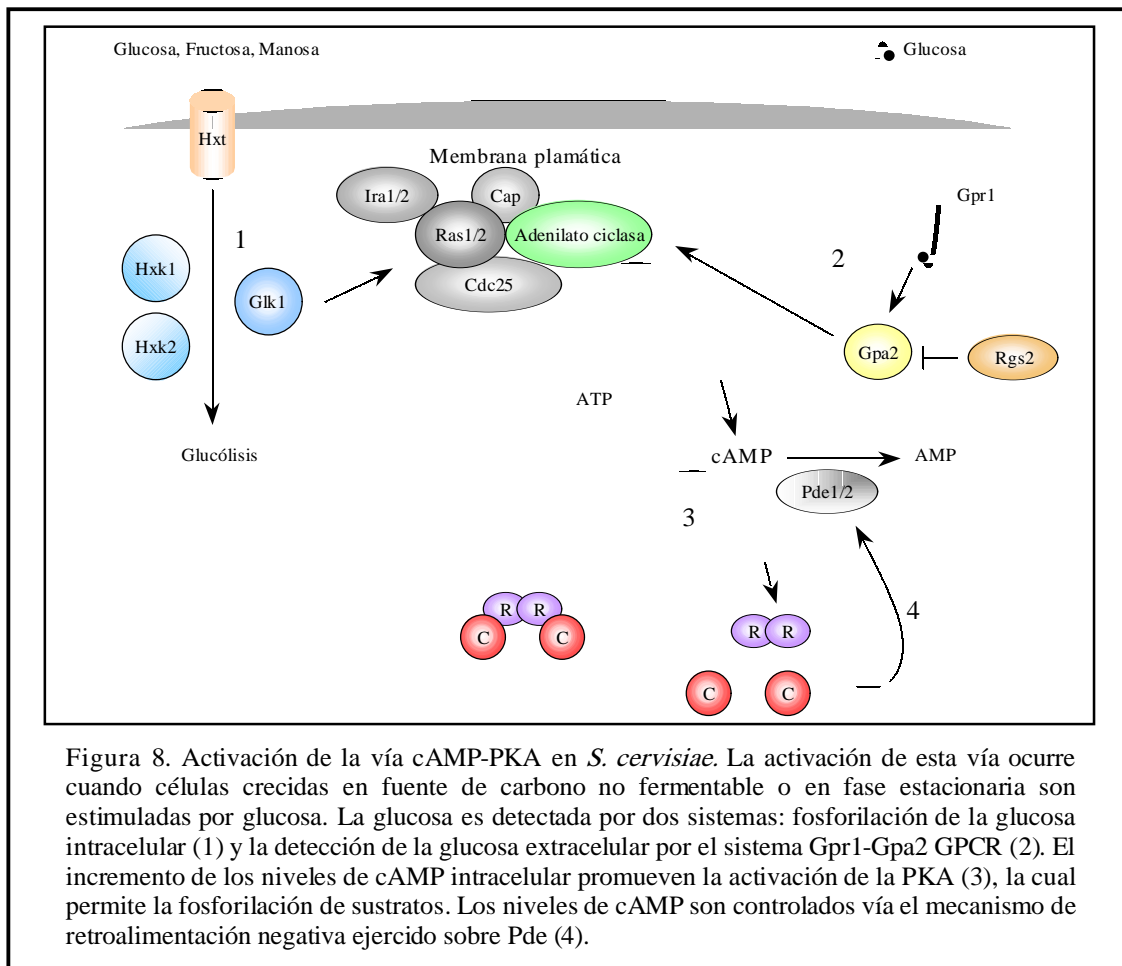
(De Winde *et al*, 1996). No se conoce aún cómo, la detección de la glucosa por parte de las hexoquinasas es transmitida río abajo de la cascada de señalización. Una proteína clave es la proteína quinasa Snf1. En presencia de glucosa, Snf1 es inactivada por Hxk2, lo cual libera la inhibición ejercida por parte de Snf1 sobre un complejo represor de la transcripción formado por las proteínas Mig1, Ssn6 y Tup1; los cuales actúan sobre los promotores de los genes gluconeogénicos y respiratorios (Treitel y Carlson, 1995). Snf1 es regulada por la enzima fosfatasa de tipo I, Glc7, la cual es dirigida hacia Snf1 por la proteína reguladora Reg1. Un blanco importante de la vía de represión por glucosa es el sistema de detección de glucosa en sí mismo y/o la vía de señalización del cAMP. Células creciendo en un medio que contiene glucosa, no señalizan vía cAMP si son estimuladas por glucosa. Sin embargo, mutantes defectivas en la ruta de represión por glucosa son capaces de generar señalización vía cAMP inducida por glucosa mientras crecen en presencia de ésta. Esto indicaría que uno (o varios) de los componentes de detección de glucosa o proteínas de la vía del cAMP están sujetas a represión por glucosa (Argüelles *et al*, 1990).

#### *Sistema Snf3-Rgt2.*

Otro sistema de detección de glucosa en *S.cerevisiae*, consiste en dos proteínas homólogas a los transportadores de glucosa Rgt2 y Snf3. Esta vía está involucrada en regular la expresión de una gran familia de transportadores de hexosa (familia Hxt, la cual consiste en 20 miembros homólogos). Snf3 responde a bajas concentraciones de glucosa, mientras que Rgt2 a altos niveles. En ausencia de glucosa el factor de transcripción Rgt1 reprime los promotores de los genes *HXT*, y esta represión es liberada por la señal generada a través de Rgt2 y Snf3. Estas proteínas son estructuralmente similares a transportadores de glucosa, pero no la transportan, por lo que se ha postulado que directamente unen glucosa extracelular (Özcan *et al*, 1996). Se piensa que la porción carboxilo terminal de ambas proteínas son responsables de transmitir la señal, posiblemente vía Mth1, proteína que se une al carboxilo terminal de Rgt2 y Snf3 (Lafuente *et al*, 2000).

*Señalización vía cAMP inducida por glucosa*

En células privadas de glucosa, creciendo en fuente de carbono no fermentable o en fase de crecimiento estacionaria, el agregado de glucosa desencadena el aumento de cAMP intracelular. Para una respuesta máxima, se requiere aproximadamente 20-50 mM de glucosa. La activación de la PKA, estimula la glucólisis y reprime los genes gluconeogénicos. La señalización vía cAMP inducida por glucosa parece ser necesaria para una re-configuración metabólica rápida durante la transición del metabolismo respiratorio al fermentativo (Kraakman *et al*, 1999).



En levaduras, la señalización vía cAMP inducida por glucosa requiere tanto del transporte como de la fosforilación de la glucosa (Figura 8, 1 y 2), pero no del metabolismo posterior

del azúcar. El transporte de la glucosa puede ser realizado por cualquiera de los transportadores de hexosas (Hxt), y no se requiere de Snf3 o Rgt2 para la activación de la síntesis de cAMP por glucosa. Entonces parecería que, si bien el transporte es esencial para disparar la señalización, éste no está involucrado en detectar y transmitir la señal hacia la vía del cAMP. La presencia de cualquiera de las tres quinasas de hexosas, Hxk1, Hxk2 o Glk1 es suficiente para generar la señal vía cAMP inducida por glucosa. Sin embargo, no se ha encontrado correlación entre los niveles de Glu-6-P y los niveles de cAMP, por lo que se infiere que las quinasas de hexosas en sí mismas están involucradas en desencadenar la señalización inducida por glucosa (Rolland *et al*, 2001).

#### *Adenilato ciclasa (Cdc35/Cyr1).*

En *S.cerevisiae* el cAMP es esencial para la viabilidad de las células. El gen de la adenilato ciclasa codifica para una proteína de 2026 aminoácidos que consiste en varios dominios: aminoterminal, un segmento rico en leucinas, una región espaciadora, dominio catalítico y la región carboxilo terminal. La enzima está asociada a la membrana plasmática y es fuertemente regulada por las proteínas Ras (Toda *et al*, 1985). La región donde reside la actividad catalítica presenta una gran homología con las adenilato y guanilato ciclasas de otros hongos y algunos mamíferos (Danchin, 1993). La región espaciadora parecería ser responsable de la regulación ejercida por las proteínas Ras. Se ha demostrado *in vitro* que mutaciones en esta región producen pérdida de la actividad ciclasa estimulada por Ras.

La región carboxilo terminal une a una pequeña proteína Cap (cyclase associated protein). Esta interacción es esencial para la estimulación de la adenilato ciclasa dependiente de Ras (Field *et al*, 1990 a y b). Se sugiere que la región rica en leucinas es importante para la localización de la adenilato ciclasa, posiblemente vía interacción con otras proteínas unidas a membrana como Ira1, Ira2 y Cdc25. La función de la región carboxilo terminal no es muy clara pero la remoción de este dominio genera hiperactividad de la ciclasa, por lo que se piensa que este dominio posee funciones reguladoras negativas sobre la actividad.

*Fosfodiesterasas de cAMP, Pde1 y Pde2.*

*S.cerevisiae* posee dos fosfodiesterasas, las cuales catalizan la ruptura del cAMP a AMP: Pde1, fosfodiesterasa de baja afinidad y Pde2, fosfodiesterasa de alta afinidad. Los fenotipos de una cepa que posee el gen PDE2 deletado presentan características similares a cepas con niveles elevados de cAMP: sensibilidad al estrés, bajos niveles de glucógeno y trehalosa, y crecimiento pobre en fuente de carbono no fermentables. La delección de PDE1, sin embargo, produce poco efecto sobre estas características.

Entre ambas proteínas, no se encuentra alta homología en sus secuencias primarias. Pde2 pertenece a la familia de las fosfodiesterasas, mientras que sólo se han encontrado homólogos a Pde1 en cuatro organismos. El rol de Pde1 parece estar limitado a la señalización vía cAMP inducido por un agonista y no afectar los niveles basales de cAMP. Esto es importante en la vía de retroalimentación negativa ejercida por la PKA sobre la señalización dependiente de cAMP (Ma *et al*, 1999).

*Proteínas Ras1 y Ras2.*

Las proteínas Ras1 y Ras2 de levaduras son proteínas homólogas a las proteínas Ras proto-oncogénicas de mamíferos y pertenecen a la superfamilia de las proteínas G monoméricas (que incluye a la familia de las proteínas GTPasas pequeñas). La delección de ambos genes *RAS* en levaduras es letal pero puede ser reemplazado por la proteína H-ras de mamíferos, indicando que la funcionalidad de estas proteínas se encuentra conservada desde levaduras hasta humanos (Kataoka *et al*, 1985). Sin embargo en *S.cerevisiae*, a diferencia de otros organismos estudiados, las proteínas Ras controlan la actividad de la adenilato ciclasa (Toda *et al*, 1985). El control ejercido sobre la adenilato ciclasa por Ras se encuentra bien documentado: *in vitro* Ras ejerce un efecto estimulador de la actividad ciclasa y los fenotipos de mutantes en *RAS1/2* y *CYR1* indican que las proteínas Ras directamente regulan la síntesis de cAMP (Field *et al*, 1990). Este comportamiento fue sorprendente ya que la adenilato ciclasa de mamíferos es controlada por subunidades  $G_{\alpha}$  activadoras e inhibitorias pertenecientes a proteínas G heterotriméricas (Gilman, 1984).

Al igual que otras proteínas G, Ras GTPasa cicla entre un estado activo unido a GTP y un estado inactivo unido a GDP. El intercambio del GDP unido a Ras por GTP es estimulado

por los factores intercambiadores del nucleótido guanina Cdc25 y Sdc25 (Boy-Marcotte *et al*, 1996). La tasa intrínseca de hidrólisis del GTP de las proteínas Ras es estimulada por las proteínas Ira1 e Ira2 (proteínas GAP: GTP-ase activating proteins) (Tanaka *et al*, 1990). Similar a la adenilato ciclasa, las proteínas Ras se encuentran unidas a membrana. Así como ocurre en mamíferos, Ras1 y Ras2 son dirigidas a membrana plasmática por farnesilación de una cisteína de la región CAAX en la región carboxilo terminal (Deschenes, 1989).

*Señalización vía cAMP inducida por glucosa y acidificación intracelular.*

Además de la glucosa la acidificación intracelular estimula la acumulación de cAMP (Thevelein *et al*, 1987 a). En comparación con la inducción generada por glucosa, la señal inducida por acidificación intracelular es mayor, perdura mas tiempo y no está sujeta a represión por glucosa (Argüelles *et al*, 1990). Debido a que el agregado de glucosa a células privadas de ésta provoca una caída transitoria del pH intracelular, inicialmente se pensaba que el efecto de la glucosa sobre los niveles de cAMP era vía acidificación intracelular. Sin embargo el agregado de glucosa, la cual es utilizada rápidamente en los primeros pasos de la glucólisis, produciría una caída transitoria del pH debido a: a) la fosforilación de la glucosa (reacción que produce protones y consume ATP) y b) la disfunción transitoria de las bombas de protones (las cuales son el principal sistema de consumo de ATP) por la caída en el contenido de ATP intracelular. El efecto de la acidificación por el agregado de glucosa puede ser “engañado” por el agregado previo de cantidades pequeñas de glucosa (por ejemplo: 5 mM). Esa pequeña cantidad de glucosa es suficiente para iniciar la glucólisis y no desencadenar la represión sobre la señalización vía cAMP por glucosa. Pocos minutos luego del agregado de 5mM de glucosa, el agregado de 100mM de glucosa dispara el incremento de los niveles de cAMP intracelulares indicando que la señalización inducida por glucosa es un mecanismo independiente de la acidificación intracelular (Thevelein *et al*, 1987b).

Con el objetivo de demostrar el rol de las proteínas Ras en la respuesta vía cAMP tanto inducida por glucosa como por acidificación intracelular, Colombo *et al*, 1998 ha determinado la cantidad de GTP y GDP unido a las proteínas Ras. El agregado de un

protonóforo, como el 2,4-dinitrofenol (DNP) que a pH extracelular bajo produce acidificación intracelular y el aumento de la relación GTP/GDP sobre Ras. Este efecto sobre las proteínas Ras, no requiere de la presencia de Cdc25 o Sdc25, pero sí depende de la presencia de las proteínas Ira1 e Ira2, sugiriendo que la acidificación intracelular estimula la síntesis de cAMP a través de la inhibición de las proteínas Ira. Sin embargo, el agregado de DNP a la cepa mutante *ira1Δira2Δ* produce un pequeño incremento en los niveles de cAMP, por lo que no se puede descartar una estimulación de la adenilato ciclasa independiente de las proteínas Ira1 y 2 (Colombo *et al*, 1998).

El agregado de glucosa también produce un rápido incremento de Ras2 unido a GTP, con el concomitante con el incremento de los niveles de cAMP. La delección de la proteína Ira2 (sólo o con Ira1) causa niveles mayores y constitutivos de GTP unido a Ras que no varían por el estímulo con glucosa, indicando que el incremento en los niveles de GTP unido a Ras inducido por glucosa podría ser mediado por la inhibición de las proteínas Ira.

El incremento de GTP unido a Ras inducido por glucosa no es dependiente de la presencia de Gpr1 o Gpa2 (proteínas que forman parte del sistema GPCR: G-protein-coupled glucose receptor, ver mas adelante). Sorprendentemente, la delección de estas proteínas provoca un incremento en el cargado de GTP unido a Ras, sugiriendo que los dos sistemas de proteínas-G (Ras y GPCR) pueden interactuar directa o indirectamente, pero en la actualidad no es claro cual es la relevancia de la interacción entre estos sistemas.

Se sabe que la inducción de los niveles de cAMP por glucosa depende del sistema GPCR, pero esto es dependiente estrictamente de la fosforilación de la glucosa. Es raro que, el ligando del sistema GPCR tenga que ser transportado y metabolizado antes que éste pueda activar vía el receptor del sistema GPCR. Se observó que, la fosforilación de la glucosa por las hexoquinas o glucoquinas es necesaria para la unión de GTP a Ras inducido por glucosa. Este resultado indica que la fosforilación de la glucosa podría mantener cierta activación sostenida de la síntesis de cAMP por aumentar la proporción de moléculas Ras unidas a GTP activas, quizás a través de la inhibición de las proteínas Ira. Entonces, la fosforilación de la glucosa podría generar un incremento en los niveles iniciales de Ras-GTP, con el objetivo de “primar” a la adenilato ciclasa para la subsecuente activación por el sistema GPCR.



En cepas mutantes, como por ejemplo *Tpk1bcy1Δ* las cuales presentan muy bajos niveles de cAMP, también se observó un nivel elevado e inducido de RasGTP, lo cual sería consistente con que Ras funcione como blanco del mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por la PKA (ver mas adelante) (Colombo *et al*, 2004). En conclusión, la estimulación de los niveles de cAMP intracelulares por la glucosa estaría aparentemente mediado por Ras2 y Gpa2. Posiblemente el doble control, por parte de ambas proteínas G (Ras2 y Gpa2), sobre la actividad de la adenilato ciclasa sirva para integrar la señalización extracelular e intracelular de la glucosa.

*GPCR: Receptor de glucosa acoplado a proteína G.*

En *S. cerevisiae* se han documentado dos sistemas GPCR distintos (Versele *et al*, 2001). El primer sistema es responsable de la detección de feromonas, las cuales determinan el “mating type”, el cual reconoce los factores  $\alpha$  y  $a$  (Dohlman *et al*, 1991). Recientemente se ha descubierto el segundo sistema que involucra el receptor Gpr1. La proteína Gpr1 se ha identificado en experimentos de doble híbrido utilizando la proteína Gpa2 ( $G_a$ ) como anzuelo.

La predicción de la estructura de la proteína Gpr1 indica que posee siete dominios transmembrana (TMD I-VII) siendo, el tercer loop intracelular y las regiones carboxilo y amino terminales son largas (Kraakman *et al*, 1999).

Se requiere de la proteína  $G_\alpha$ Gpa2 para la activación de la vía del cAMP inducida por glucosa y ésta actúa como una proteína G estimuladora sobre la adenilato ciclasa (Colombo *et al*, 1998). La actividad de Gpa2 es controlada por la proteína RGS, Rgs2 (Versele *et al*, 1999) (Figura 8, 2). Una cepa mutante en el receptor Gpr1 es incapaz de sintetizar cAMP inducido por glucosa y presenta un retraso temporal en la activación de los blancos de la vía cAMP-PKA, los cuales son inducidos durante la iniciación de la fermentación de la glucosa (Kraakman *et al*, 1999).

Se ha propuesto que el sistema GPCR, compuesto por las proteínas Gpr1, Gpa2 y Rgs2, es un sistema de detección de glucosa que controla la vía de síntesis del cAMP en función de la disponibilidad de glucosa; donde Gpr1 es considerado el receptor de glucosa (Versele *et al*, 2001).

Como se ha indicado antes, la señalización a través del sistema Gpr-GPCR presenta una complicación adicional, ya que la fosforilación de la glucosa es esencial para la estimulación de la síntesis del cAMP por glucosa. Si bien se ha postulado una hipótesis acerca de la necesidad de incorporación/fosforilación de la glucosa, no existe evidencia experimental directa que explique porque el sistema GPCR es incapaz de causar una activación rápida de la adenilato ciclasa a menos que su ligando, la glucosa, sea transportado dentro de la célula y fosforilado.

La fosforilación de la glucosa (y fructosa) pueden disparar un pequeño incremento en los niveles de cAMP en ausencia del receptor Gpr1. Por lo tanto, para una investigación correcta de las propiedades cinéticas del receptor es necesario separar los efectos de la fosforilación de la glucosa de los verdaderos efectos dependientes de Gpr1. Esto puede ser logrado por el agregado previo de bajos niveles de glucosa para saturar el sistema dependiente de la fosforilación de la glucosa, como se ha demostrado previamente para Gpa2 (Colombo *et al*, 1998). Recientemente, Lemaire *et al*, 2004, han demostrado que la glucosa y la sacarosa actúan como ligandos agonistas, mientras que la manosa como ligando antagonista de receptor Gpr1. Utilizando mutantes de reemplazo de diferentes aminoácidos, ubicados dentro del TMD VI, por cisteína y el método SCAM (substituted cysteine accessibility method) se observó que los residuos ubicados en el bolsillo formado por los dominios transmembrana son los responsables de la unión de los azúcares. La afinidad por la glucosa resultó aproximadamente 20 mM, mientras que para la sacarosa 0.5 mM. Tanto la glucosa, manosa, sacarosa, galactosa y fructosa son azúcares muy similares estructuralmente. La manosa, por ejemplo, solo difiere de la glucosa en el grupo OH- del carbono 2, donde pasa de una posición axial en la primera a una posición ecuatorial en la glucosa. En este sentido, la observación que la manosa puede unirse al receptor pero no disparar una señalización, indica un posible rol para el grupo -OH del carbono 2 de la glucosa en la activación del receptor.

*Mecanismo de retroalimentación negativa ejercida por la PKA sobre la señalización vía cAMP.*

La señalización vía cAMP inducida por un agonista esta fuertemente controlada por un mecanismo de retroalimentación negativa ejercida por la PKA (Figura 8, 4). El aumento en los niveles de cAMP inducidos por un agonista, activa a la PKA la cual regula negativamente uno o mas componentes río arriba de la vía de señalización. Como consecuencia, los niveles de cAMP decrecen rápidamente a valores similares previos a la inducción. La potencia de este mecanismo es ilustrado en mutantes con baja actividad PKA (cepa *tpk1<sup>wl</sup>*). Estas cepas poseen niveles de cAMP 100 veces mayores respecto a una cepa salvaje, cuando son estimuladas por glucosa o DNP (Mbonyi *et al*, 1990). En contraste, mutantes con alta actividad PKA (cepa *bcy1Δ*) presentan valores bajos y constitutivos de cAMP luego de un estímulo con glucosa, debido a una retroalimentación negativa fuerte y sostenida.

Se han sugerido diferentes componentes de la vía del cAMP como blancos de este sistema. En respuesta a glucosa, Cdc25 es hiperfosforilado por PKA lo cual provoca su disociación de Ras (Gross *et al*, 1988). Ras2 es fosforilado *in vitro* por PKA, lo que provoca una menor capacidad de activación de Ras sobre la adenilato ciclasa (Resnick y Racker, 1988). Recientemente, se ha demostrado que la fosfodiesterasa de baja afinidad Pde1 es fosforilada *in vivo* por PKA, y la delección de esta proteína provoca una señal inducida por glucosa mucho mayor (Ma *et al*, 1999). Estos resultados, indicaron que la actividad de Pde1 esta asociada al control de los niveles de cAMP inducidos por agonistas, mientras que Pde2 controla los niveles basales de cAMP.

Sin embargo, la delección de cada proteína ubicada río arriba en la vía de señalización cAMP-PKA por separado no resulta valores similares de cAMP hiperacumulados en la cepa *tpk1<sup>wl</sup>*. Esto indica que, probablemente diferentes blancos contribuyen al mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por la PKA o quizás algún blanco importante no se ha caracterizado aun.

Además de este mecanismo, la actividad PKA es necesaria para una represión de la señal vía cAMP inducida por glucosa (Mbonyi *et al*, 1990). Como se describió anteriormente, la

vía cAMP inducida por glucosa también está sujeta a represión por glucosa. No se ha identificado aún la/las proteínas blanco de esta regulación.

*Blancos de la señalización vía cAMP inducida por glucosa.*

En levaduras, la PKA controla muchos blancos diferentes tanto a nivel post-traducciona como a nivel transcripcional. La PKA controla el cambio desde un metabolismo no fermentativo a fermentativo en respuesta a cantidades suficientes de azúcares fermentables.

*Vice versa*, cuando el azúcar fermentable comienza a ser limitante y las células transitan el crecimiento diauxico, momento en el cual las células dejan de fermentar la glucosa y comienzan a respirar el etanol producido por la fermentación, la PKA regula la adaptación al crecimiento gluconeogénico. Además, la PKA modula la respuesta general a condiciones de estrés del medio ambiente, controla el ciclo celular en la transición G1 a S en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y regula el crecimiento pseudohifal que se desarrolla en presencia de glucosa pero ausencia de fuente de nitrógeno.

El cAMP es esencial para modular la actividad de la PKA, pero existen evidencias que indicarían que la regulación de la actividad PKA no sólo depende del cAMP. Un ejemplo es la vía de señalización FGM (*f*ermentable *g*rowth *m*edium-induced pathway). La proteína Sch9 presenta alta homología de secuencia con las tres Tpk, con la proteína quinasa B (PKB) y con la PKA de mamíferos. La proteína quinasa Sch9 se requiere para la activación de esta vía; por ejemplo, cuando las células son estimuladas por el agregado de una fuente de nitrógeno en presencia de glucosa se observa una estimulación de la actividad de la trehalasa neutra (ver mas adelante). Se ha planteado que la vía FGM sería esencial para el mantenimiento de todas las características fenotípicas dependientes de PKA, ya que la señalización vía cAMP inducida por glucosa se presume transitoria. Se ha planteado también que la respuesta sostenida en un medio que contiene glucosa es realizada por la vía FGM, porque los niveles basales de cAMP son similares en un medio fermentable como no fermentable. Aún no se ha establecido la interconexión de la vía FGM y cAMP-PKA (Thevelein y de Winde, 1999). Sea porque Sch9 media sus efectos sobre los mismos blancos de PKA (ya que ambas quinasas controlan los mismos blancos) o porque Sch9 activa a Tpk o viceversa (Roosen *et al*, 2001).

En la actualidad se han caracterizado (en forma directa o indirecta) varias proteínas blanco de la PKA: Nth1 (trehalasa neutra), Fbp1 (fructosa bifosfatasa), varios factores de transcripción y varias quinasas que actúan río debajo de PKA.

Alguno de ellos, son los factores de transcripción involucrados en la respuesta general al estrés, Msn2 y Msn4, el factor de transcripción Gis1, el factor Adr1 que regula la expresión de *ADH2* que codifica para una enzima clave de la vía gluconeogénica, el factor de transcripción Sok2 está involucrado en el control del crecimiento, el factor de transcripción Rap1 que induce los genes de las proteínas ribosomales, Phd1 y Ash1 que regulan el crecimiento pseudohifal y el factor Flo8 que regula la expresión del gen de la floculina, *FLO11*. Además, varias proteínas se han funcionalmente ubicadas río debajo de PKA: Rim15 involucrada en la regulación de la entrada a fase estacionaria, Yak1 relacionada con el crecimiento y Sch9. A continuación, se describen con mas detalle, los blancos de PKA que fueron usados como marcadores *in vivo* de la actividad PKA.

#### *Función y regulación de los niveles de trehalosa y glucógeno.*

La trehalosa es un disacárido ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-1,1- $\alpha$ -D-glucopiranosido) presente en muchos hongos. La principal característica de estos organismos es que pueden soportar grandes períodos de tiempo en casi desecación. En levaduras, la trehalosa no se detecta durante la fase exponencial de crecimiento pero puede acumularse hasta un 20% del peso seco durante la fase estacionaria de crecimiento. Si bien se ha considerado a la trehalosa como un carbohidrato de reserva, similar al glucógeno, esta idea a cambiado gracias a propiedades inusuales de la trehalosa. Primero, no se acumula durante la fase exponencial (como lo hace el glucógeno), sólo se acumula cuando la glucosa comienza a escasear y su síntesis continúa durante la fase estacionaria, siempre cuando el glucógeno comienza a ser degradado. La trehalosa comienza a degradarse luego de largos períodos de hambreado y esto coincide con la pérdida de la viabilidad celular. *In vivo*, niveles elevados de trehalosa se correlacionan con alta resistencia al estrés y diversas condiciones de estrés inducen la acumulación de trehalosa (Neves *et al*, 1991). Por sus características, la trehalosa es un carbohidrato con funciones de protección más que de reserva de carbohidratos. La trehalosa es sintetizada en dos pasos a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-P. La enzima Tps1

(trehalosa-6-P-sintasa) cataliza la reacción desde el UDP-glucosa y glucosa-6-P a trehalosa; la enzima Tps2 (trehalosa-6-P-fosfatasa) cataliza la defosforilación final de la trehalosa-6-P a trehalosa. Además, el complejo proteico (formado por Tps1 y Tps2) posee dos subunidades regulatorias Tps3 y Tsl1 (Bell *et al*, 1998).

La trehalosa puede ser degradada por tres enzimas distintas: Nth1, Nth2 (trehalasa neutra, citosólica) y Ath1 (trehalasa ácida, vacuolar). Ya que la trehalosa solo se acumula en citoplasma no es claro aún el rol de Ath1, pero la delección del gen *ATH1* impide el crecimiento en presencia trehalosa como fuente de carbono. Nth2, a diferencia de Nth1, no parece tener un rol importante en la degradación de la trehalosa *in vivo*, siendo Nth1 quien principalmente degrada el carbohidrato (Nwaka *et al*, 1995).

Los niveles de trehalosa se encuentran muy regulados por la actividad PKA. Mutantes que presentan alta actividad PKA son deficientes en acumular trehalosa en fase estacionaria o luego de condiciones de estrés suaves (por ejemplo estrés térmico suave). En contraste, mutantes con baja actividad PKA acumulan niveles altos de trehalosa, aún durante la fase exponencial sobre glucosa (Cameron *et al*, 1988). Se observa una buena correlación entre el aumento de actividad trehalasa y la señal vía cAMP inducida por glucosa (Thevelein, 1984). Además, se ha demostrado *in vitro* que el tratamiento de la trehalasa con fosfatasas la inactiva, y su actividad es restablecida por fosforilación con subunidad catalítica, lo que coincide con la incorporación de fosfatos en Nth1 (App y Holzer, 1989). No se ha caracterizado aún los sitios de fosforilación por PKA que son esenciales para la activación *in vivo* de la trehalasa (Wera *et al*, 1999). Se ha demostrado que la acumulación de la trehalosa es importante para la protección de proteínas *in vivo*, previo a condiciones de estrés que puedan desnaturalizarlas (como calor). Cuando las células retornan a las condiciones normales de crecimiento, la recuperación es llevada a cabo por las “Hsp’s” (heat shock proteins, particularmente Hsp104) y, paradójicamente, altos niveles de trehalosa inhiben el correcto funcionamiento de las Hsp, que consiste en facilitar el plegamiento de proteínas parcialmente desnaturalizadas luego del estrés térmico. Estas observaciones permiten comprender la regulación de la trehalosa y la trehalasa. Se ha observado que la transcripción del gen *NTH1* es inducida por estrés térmico, concomitante con la acumulación de la trehalosa; los niveles de trehalosa descienden rápidamente cuando

las células vuelven a sus condiciones iniciales, a pesar que la acumulación de trehalosa es compatible con la actividad enzimática. Este comportamiento es diferente a la expresión de las Hsp, ya que su expresión desciende lentamente luego de finalizado el estrés. Por lo tanto, la degradación rápida de los niveles de trehalosa parece ser tan importante como la acumulación antes y durante el estrés. Además del efecto de PKA sobre la estimulación de la degradación de la trehalosa, la expresión del gen *NTH1* ( trehalasa neutra) (Zähringer *et al*, 2000) y de los genes *TPS1* y *TPS2* (Winderickx *et al*, 1996) es regulados por PKA vía una mecanismo dependiente de elementos STRE en sus promotores (ver luego).

A diferencia de la trehalosa, el glucógeno se comporta como un típico carbohidrato de reserva. Éste es sintetizado durante el crecimiento exponencial en glucosa y es degradado durante condiciones de hambreado. El glucógeno es sintetizado a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-P. La síntesis comienza por la auto-glicosilación de las proteínas Glg1 y Glg2. La glucógeno sintasa esta codificada por la *GSY1*, *GSY2* y *GSY3*. La degradación del glucógeno es catalizada por la enzima fosforilasa Gph1. Actividad de PKA alta inhibe la acumulación de glucógeno (Cameron *et al*, 1988). Tanto *GPH1* como *GSY2* contienen elementos STRE en sus promotores, siendo reprimidos por altos niveles de cAMP e inducidos durante el crecimiento diáuxico (Boy-Marcotte *et al*, 1998). Además, la proteína quinasa Snf1, la cual pertenece a la vía principal de represión por glucosa, juega un importante rol en la síntesis del glucógeno. Por lo tanto, la vía principal de represión por glucosa y la vía dependiente de cAMP, controlan los niveles de glucógeno en respuesta a las concentraciones extracelulares de glucosa (de Winde *et al*, 1997). Por último, en analogía a la sintasa de glucógeno de mamíferos, la cual es regulada por GSK (Glycogen Synthase Kinase), la fosforilación de Gsy1 y Gsy2 parece ser importante para su activación, pero no se han identificado aún proteínas quinasas o fosfatasas.

#### *Regulación transcripcional por PKA: control de la resistencia a estrés*

Las células de levaduras expuestas a condiciones de estrés suaves, desarrollan resistencia no sólo a dosis mayores del mismo tipo de estrés, sino que resisten a otras condiciones de estrés. Este mecanismo de protección cruzada se basa en la presencia de un elemento (STRE) dentro de promotores de varios genes, el cual fue identificado por primera vez en el

promotor de *CTTI* (gen que codifica para la catalasa citosólica) y *DDR2* (cuyo producto génico esta involucrado en la respuesta al daño en el DNA inducida por UV). El elemento STRE (Stress Responsive Elements) posee una secuencia consenso AGGGG, en cualquier orientación y permite la inducción transcripcional por varios tipos de estrés (Ruis y Schuller, 1995). Los genes regulados por elementos STRE también son inducidos durante el crecimiento diáuxico. En mutantes con alta actividad PKA, los genes regulados por elementos STRE se encuentran reprimidos; mientras que en mutantes con baja actividad, se expresan constitutivamente. Esto indica que la vía del cAMP regula negativamente la expresión génica mediada por elementos STRE. Otras vías de señalización, como la vía MAP quinasa, involucrada en la resistencia a condiciones de estrés osmótico, regulan la expresión controlada por elementos STRE (Schuller *et al*, 1994). Algunos de los genes regulados por elementos STRE son: proteínas de estrés térmico (*HSP104*, *HSP12*, *HSP26*), genes involucrados en la resistencia a estrés oxidativo (*CTTI*, que codifica para una catalasa citosólica; *SOD2*, que codifica para una superóxido dismutasa), la trehalosa sintasa (*TPS1* y *TPS2*), la trehalasa neutra (*NTH1*), glucógeno sintasa (*GSY2*) y la glucógeno fosforilasa (*GPH1*).

Los factores de transcripción Msn2 y Msn4 son proteínas que poseen estructura tipo “de dos” de zinc  $C_2H_2$ , los cuales reconocen los elementos STRE (Martinez-Pastor *et al*, 1996). La regulación de la actividad del factor Msn2 es a través del control de la unión de éste al elemento del promotor. La localización intracelular de Msn2 y Msn4 depende de las condiciones de estrés. Durante la fase de crecimiento logarítmica, la localización de ambos factores es citoplasmática. Sin embargo, bajo condiciones de estrés o ausencia de glucosa en el medio extracelular, se concentran rápidamente en el núcleo. La localización de estos factores también depende de los niveles de actividad PKA ya que, la localización nuclear ocurre si los niveles de PKA son bajos. Alta actividad PKA podría entonces contrarrestar la importación nuclear disparada por el estrés, acelerar la exportación nuclear o cambiar la interacción con factores de retención localizados (Görner *et al*, 1998). La conexión entre el sistema PKA y los componentes transcripcionales de la respuesta a estrés es muy importante. La regulación negativa por parte de PKA sobre Msn2 y Msn4, y como consecuencia de los genes regulados por elementos STRE, es un requerimiento clave para



el crecimiento y la viabilidad celular. Células de levaduras que carecen de PKA no son viables, pero la delección adicional de *MSN2/MSN4* o del gen *YAK1* permite el crecimiento (Smith *et al*, 1998).

Recientemente se ha descrito que la vía de señalización TOR regula la localización de los factores Msn2 y Msn4. Las levaduras contienen dos proteínas quinasas TOR, Tor1 y Tor2, las cuales responden a cambios en la disponibilidad de nutrientes, tanto de la fuente de carbono como de nitrógeno, regulando el crecimiento celular.

Se ha sugerido que la inactivación de las proteínas Tor es un requisito para la acumulación nuclear de Msn2 durante la falta de fuente de nitrógeno (Beck y Hall 1999). Recientemente, Görner *et al*, 2002, han demostrado que el dominio que contiene la señal de localización nuclear (NLS) en Msn2 es fosforilado tanto *in vivo* como *in vitro* por PKA y han sugerido que la función del NLS es anulada por fosforilación y es activada por defosforilación. Se ha observado que el estado de fosforilación del NLS es dependiente de la disponibilidad de glucosa en el medio, por lo que sugieren que la PKA es quien señala la disponibilidad de glucosa a Msn2.

#### *La PKA estimula la glicólisis e inhibe la gluconeogénesis*

Además de la regulación transcripcional sobre los genes gluconeogénicos y respiratorios que ejerce la vía principal de represión por glucosa, la señalización vía cAMP inhibe el metabolismo gluconeogénico en presencia de azúcares fermentables. Mutantes con alta actividad PKA son incapaces de crecer sobre fuente de carbono no fermentable (Cameron *et al*, 1988). Por ejemplo, el factor de transcripción Adr1 es regulado negativamente por PKA vía fosforilación. Éste es esencial para la expresión del gen *ADH2*, el cual codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa II; CTA1, catalasa peroxisomal; GUT1 que codifica para la glicerol quinasa, la cual participa del primer paso en el metabolismo del glicerol.

Además, PKA regula negativamente la expresión de *ADRI*, lo que provoca niveles muy bajos del factor de transcripción. Además del control ejercido por PKA, la expresión de *ADH2* es controlada por la proteína quinasa Snf1, independiente de Adr1 (Dombeck *et al*, 1993).

Se ha reportado que la PKA inhibe la actividad de varias enzimas, como la fructosa-1,6-bisfosfatasa (esencial para la gluconeogénesis) y estimula la actividad de la fosfofructoquinasa 2 (una enzima clave en la regulación de la glucólisis).

*Objetivos.*

Las proteínas quinasas son responsables de la regulación de una amplia variedad de procesos fisiológicos a través de la fosforilación de proteínas blanco, las cuales son estructuralmente y/o funcionalmente diferentes. Se ha estimado que alrededor del 2% del genoma de organismos vertebrados codifica para proteínas quinasas, por lo que se las clasifica como la familia más abundante (Hunter *et al*, 1994). La proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) pertenece a la familia de las serina/treonina proteínas quinasas, y es el miembro mejor caracterizado dentro de esta familia. Se conoce que la fosforilación de proteínas sustratos es crítica para regular varios procesos celulares que incluyen metabolismo, expresión génica, flujo iónico, y muerte celular (Walsh *et al*, 1992). La holoenzima PKA (R<sub>2</sub>C<sub>2</sub>) se mantiene inactiva en presencia de concentraciones bajas de cAMP. Cuando los niveles de cAMP aumentan, evocados por un estímulo específico, dos moléculas de cAMP se unen a cada subunidad regulatoria (R). Este evento provoca la liberación de la subunidad catalítica (C), permitiendo la fosforilación de distintos sustratos. Este mecanismo de activación no es un modelo plausible que pueda explicar la variedad de respuesta como consecuencia de la acción de diferentes drogas o estímulos extracelulares; los cuales activan la misma vía del cAMP.

Se han descrito varios mecanismos que controlan la activación temporal y espacial de la PKA; como por ejemplo: gradientes intracelulares y nanocompartimentos de cAMP los cuales se generan por el efecto opuesto de la actividad de la adenilato ciclasa y fosfodiesterasas (Zaccolo y Pozzan, 2002). Otro factor es la restricción espacial de la PKA a través de la asociación con proteínas de anclaje (AKAP, A-Kinase Anchoring Proteins), las cuales actúan para determinar la especificidad de respuesta de la PKA debido a la formación de complejos macromoleculares que asocian varias proteínas de una misma vía (Skälhegg *et al*, 2000). Muchas enzimas quinasas son en si mismas fosfoproteínas, modificación que afecta no sólo su actividad catalítica sino su regulación (Johnson *et al*, 1996). Por último, se ha demostrado que los sustratos participan en la activación de la holoenzima, cuando ésta se encuentra saturada con cAMP, como consecuencia del incremento de los niveles de cAMP intracelulares (Vigil *et al*, 2004; Zarembeg *et al*, 2000).

La regulación específica de la fosforilación de proteínas depende de la precisión del reconocimiento molecular de la PKA por las proteínas blanco. Por lo tanto el conocimiento de los mecanismos que rigen el reconocimiento del sustrato por parte de las proteínas quinasas y la comparación de la especificidad del sustrato de esas enzimas ha permanecido como una pregunta clave en el estudio de la regulación de la fosforilación de proteínas.

El objetivo general de esta tesis fue profundizar en el conocimiento del mecanismo de activación de la PKA *in vivo*, donde se consideran los procesos bioquímicos y fisiológicos celulares que afectan a dicho mecanismo.

Con la finalización del proyecto de secuenciación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* y el conocimiento actual de la vía cAMP-PKA en levaduras, este organismo surge como un excelente modelo para el estudio del mecanismo de activación de la PKA. La PKA es una proteína quinasa estructuralmente y funcionalmente muy conservada, por lo que el empleo de levaduras permite comprender el mecanismo de activación en organismos eucariotas superiores.

El Capítulo 1 y parte del Capítulo 2, describen la caracterización del empleo de células permeabilizadas de *S.cerevisiae* como herramienta para determinar la actividad PKA *in vivo*, método que conserva la localización e interacción con otras proteínas celulares. Además el Capítulo 2 describe la fosforilación reversible de la subunidad catalítica Tpk1, la cual depende de la fuente de carbono disponible en el medio extracelular.

Finalmente, en el Capítulo 3 se describe la caracterización cinética de dos nuevos sustratos de PKA, Pyk1 y Pyk2. Utilizando el sustrato nativo Pyk1, se estudió el comportamiento de éste como sustrato y, de manera preliminar, su participación en el mecanismo de activación de la holoenzima.

Los capítulos están escritos con un estilo similar a una publicación científica. Cada uno de ellos comienza con una introducción breve, la cual esta contenida en la introducción general, una lista de las cepas de levaduras utilizadas, una sección de resultados, y una sección de discusión. Utilicé este estilo porque permite la lectura individual de cada capítulo. Al final de los capítulos se presenta la integración de las principales conclusiones

obtenidas durante el desarrollo de esta tesis. Finalmente se presenta una sección de Materiales y Métodos, donde se detallaron las técnicas empleadas que fueron modificadas durante el desarrollo de este trabajo.

El desarrollo de esta Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

-Portela P, Van Dijck P, Thevelein JM, Moreno S (2003). Activation state of protein kinase A as measured in permeabilised *Saccharomyces cerevisiae* cells correlates with PKA-controlled phenotypes *in vivo*. *FEMS Yeast Res.* 3:119-26.

-Portela P, Howell S, Moreno S, Rossi S (2002) *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by protein kinase A. *J Biol Chem.* 277:30477-87.

-Portela P\*, Zaremborg V\*, Moreno S (2001) Evaluation of *in vivo* activation of protein kinase A under non-dissociable conditions through the overexpression of wild-type and mutant regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 147:1149-59.

\* igual contribución.

-Paula Portela and Silvia Moreno. Glucose-dependent activation and phosphorylation of protein kinase A in *Saccharomyces cerevisiae*. Manuscrito en preparación.

-Paula Portela, Silvia Moreno and Silvia Rossi Characterization of yeast pyruvate kinase 1 as a proteina kinase a substrate. Manuscrito en preparación.

## Capítulo 1

La actividad de la Proteína Quinasa A determinada en células permeabilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* correlaciona con los fenotipos controlados por PKA *in vivo*.

### 1.1) Introducción

En levaduras, la PKA modula la respuesta a condiciones de estrés del medio ambiente y el cambio del metabolismo fermentativo a respiratorio, ejerciendo su acción a nivel transcripcional y post-traducciona (Thevelein *et al*, 1999).

Con el objetivo de evaluar la función o el efecto de una proteína sobre la vía de señalización cAMP-PKA, es habitual abordar el análisis a través del estudio de las características fenotípicas relacionadas con PKA (niveles de trehalosa, glucógeno, resistencia al estrés térmico, etc.) utilizando cepas que sobrepresan y/o carecen del gen que codifica a la proteína en estudio en combinación con alteraciones adicionales en proteínas de la ruta cAMP-PKA.

Para la determinación de la actividad PKA *in vitro*, actividad total y dependencia con el cAMP, se eligen condiciones experimentales en las cuales la actividad y la concentración de enzima mantengan una relación lineal.

Bajo estas condiciones, el grado de activación de la PKA determinada *in vitro*, podría no reflejar el grado de activación de la enzima en células intactas debido a la dilución impuesta por las condiciones de ensayo. Tales condiciones podrían producir el desplazamiento del equilibrio de asociación-disociación de la holoenzima hacia el estado disociado, aún en ausencia de cAMP agregado. Este efecto no deseado en los ensayos *in vitro*, sería más severo en el caso de la PKA de *S.cerevisiae*, ya que la afinidad de la interacción entre las subunidades R y C en este organismo es menor que en la PKA de eucariotas superiores (Kuret *et al*, 1988).

Con el objetivo de analizar las propiedades cinéticas de la PKA a diferentes concentraciones de enzima, se han utilizado células permeabilizadas (ensayo denominado *in situ*, alta concentración de enzima) o extracto crudo (*in vitro*, baja concentración de enzima) de *Mucor rouxii* ( Sorol *et al*, 2001). En este trabajo se encontraron diferencias importantes en la actividad específica aparente de la PKA con kemptido y cuatro sustratos peptídicos. Este estudio indicó, además, que la dilución enzimática empleada en los ensayos *in vitro* afecta la especificidad de sustrato y la capacidad de activación de la PKA por diferentes análogos del cAMP.

En el presente capítulo evaluamos, si la determinación de la actividad PKA en células permeabilizadas de *S.cerevisiae* es un parámetro válido de la actividad quinasa en células intactas. Para este propósito, hemos correlacionado la actividad enzimática determinada *in situ* con la severidad de fenotipos dependientes de PKA determinados *in vivo*, utilizando cepas mutantes de PKA crecidas en diferentes fuentes de carbono.



Cepas utilizadas en este capítulo.

| Nomenclatura | Descripción                | Fenotipo principal   |
|--------------|----------------------------|--|
| WT           | KT1115+Yep51Gal10          | Cepa salvaje, transformada con el vector vacío.  |
| WTBCY        | KT1115+Yep51Gal10-BCY1     | Cepa salvaje, sobreexpresión de Bcy1p en galactosa, baja actividad PKA respecto a la salvaje (WT)          |
| 14           | KT1451+ Yep51Gal10         | Cepa mutante transformada con el vector vacío, actividad PKA alta.   |
| 14bcy        | KT1451+ Yep51Gal10-bcy1-14 | Cepa mutante, sobreexpresión de la versión mutada bcy1-14, actividad PKA intermedia, menor que la cepa 14. |

## 1.2) Resultados

Actividad de la PKA en extractos crudos.

El primer objetivo fue investigar si la determinación de la actividad y el grado de activación de la PKA en extractos crudos es un parámetro representativo del estado de activación de la PKA dentro de la célula. Para esto, se determinó la actividad quinasa en extracto crudo de una cepa de levadura con o sin sobreexpresión de la subunidad R salvaje. Diferentes cantidades de extracto crudo de las cepas WTBCY y WT (ver tabla cepas utilizadas) se ensayaron en presencia o ausencia de 10  $\mu$ M de cAMP utilizando kemptido como sustrato, bajo condiciones estándares de ensayo (*M&M13*). La actividad del extracto crudo de la cepa WT, con o sin cAMP, fue lineal hasta 10  $\mu$ g/ml de proteínas (Figura 1 A). Como era de esperar para ensayos enzimáticos en los cuales se usan extractos crudos, cuando se utilizó una concentración alta de proteínas, la actividad quinasa no fue proporcional a la concentración y por lo tanto subestimada. La relación de actividades  $-/+$  cAMP representa el grado de activación de PKA; valores cercanos a 1 indican que la actividad quinasa es independiente de cAMP, mientras que valores cercanos a 0 indican dependencia.

Se utilizó este parámetro para evaluar como el equilibrio de asociación/disociación es afectado por las condiciones de ensayo, específicamente la concentración de proteínas. La Figura 1C muestra que la relación  $-/+$  cAMP no permanece constante dentro de los valores donde la actividad catalítica fue lineal con la concentración de proteínas utilizada en el ensayo.

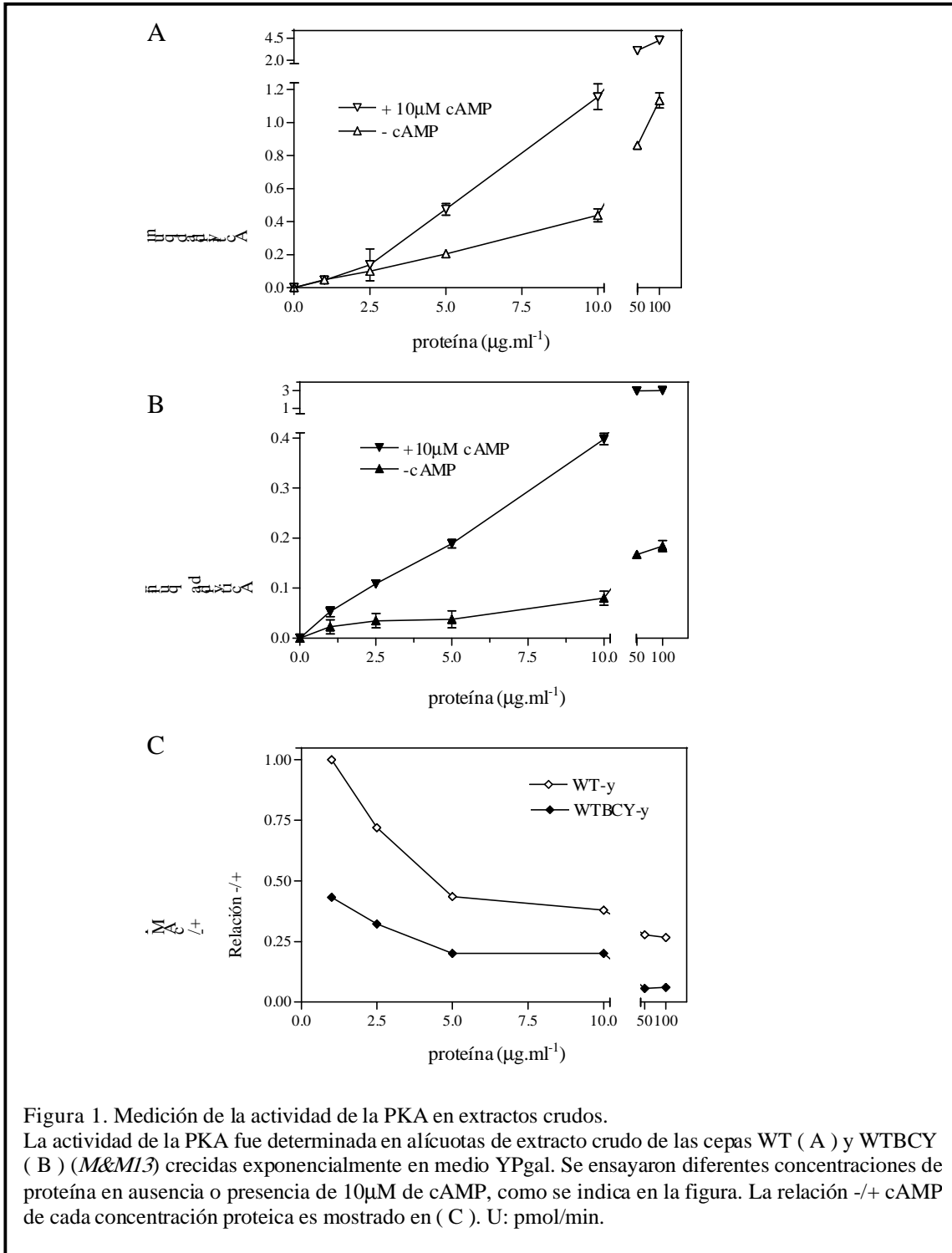


Figura 1. Medición de la actividad de la PKA en extractos crudos. La actividad de la PKA fue determinada en alícuotas de extracto crudo de las cepas WT ( A ) y WTBCY ( B ) (*M&M13*) crecidas exponencialmente en medio YPgal. Se ensayaron diferentes concentraciones de proteína en ausencia o presencia de 10 $\mu\text{M}$  de cAMP, como se indica en la figura. La relación +/- cAMP de cada concentración proteica es mostrado en ( C ). U: pmol/min.

En el caso del extracto crudo de la cepa WT, la relación  $-/+$  cAMP cambia desde 1 (completamente independiente de cAMP) a 0.4, cuando las concentraciones utilizadas en el ensayo son de 1 a 10  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

Este resultado indica, una fuerte dependencia entre el grado de activación de la PKA determinado *in vitro* y la concentración de proteínas. Es de notar, que esta dependencia es mucho menor entre 5-10  $\mu\text{g/ml}$ , y el mayor efecto se observó a concentraciones menores.

Previamente hemos descripto que la sobreexpresión de la subunidad R desplaza el equilibrio de asociación/disociación de la holoenzima hacia el estado de asociación (Portela *et al*, 2001). Este efecto puede ser observado en las Figuras 1B y 1C, donde la relación  $-/+$  cAMP de la cepa WTBCY, dentro del rango lineal de actividad, está desplazado aproximadamente de 0.5 a 0.2.

Esto indica que el grado de asociación/disociación de la holoenzima en el mismo rango de concentración proteica, es desplazado hacia el estado de asociación por la sobreexpresión de Bcy1, compensando el efecto de la dilución sobre la interacción entre subunidades.

Si se intenta estimar la relación  $-/+$  cAMP cuando se utilizan concentraciones proteicas altas (50-100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), en condiciones donde no se conserva la proporcionalidad con la actividad, la relación  $-/+$  cAMP resultará solo aparente. Estos valores son sobrestimados, ya que la linealidad de la actividad determinada en presencia de cAMP se pierde a concentraciones proteicas menores que la actividad ensayada en ausencia de cAMP (Figura 1A y 1B).

En conclusión, el estado de disociación de la PKA, determinado *in vitro*, cambia drásticamente con la concentración de proteínas. Este cambio se observó aún, bajo condiciones de proporcionalidad entre actividad y concentración. Por lo tanto, el ensayo *in vitro* no puede ser usado como una metodología fidedigna del estado de activación de la PKA *in vivo*.

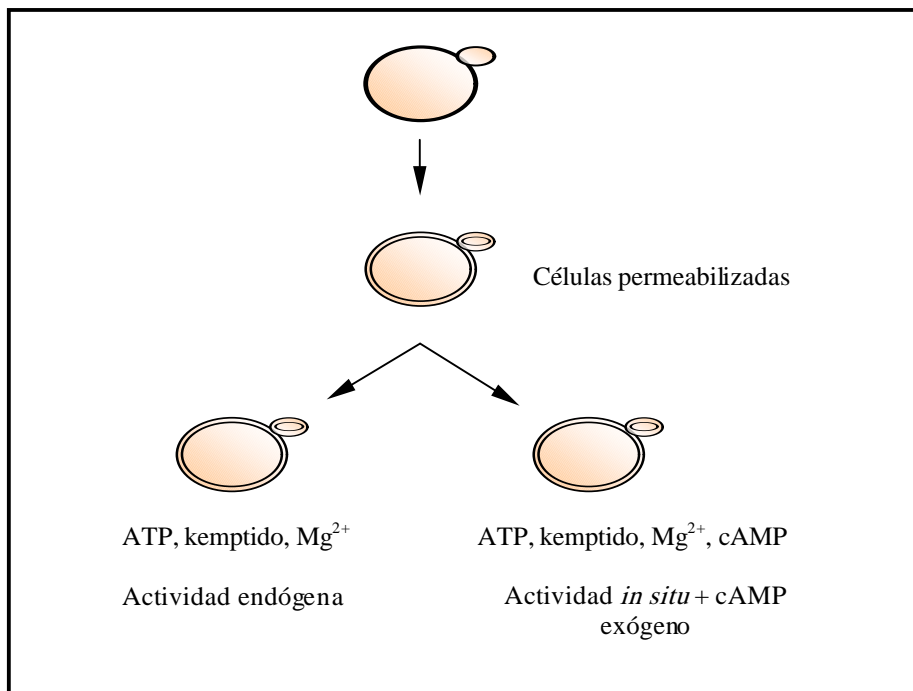
La actividad PKA en células permeabilizadas.

Para evitar el efecto que las condiciones de ensayo *in vitro* ejercen sobre el estado de activación de la PKA, se determinó el estado de activación *in situ* usando células permeabilizadas.

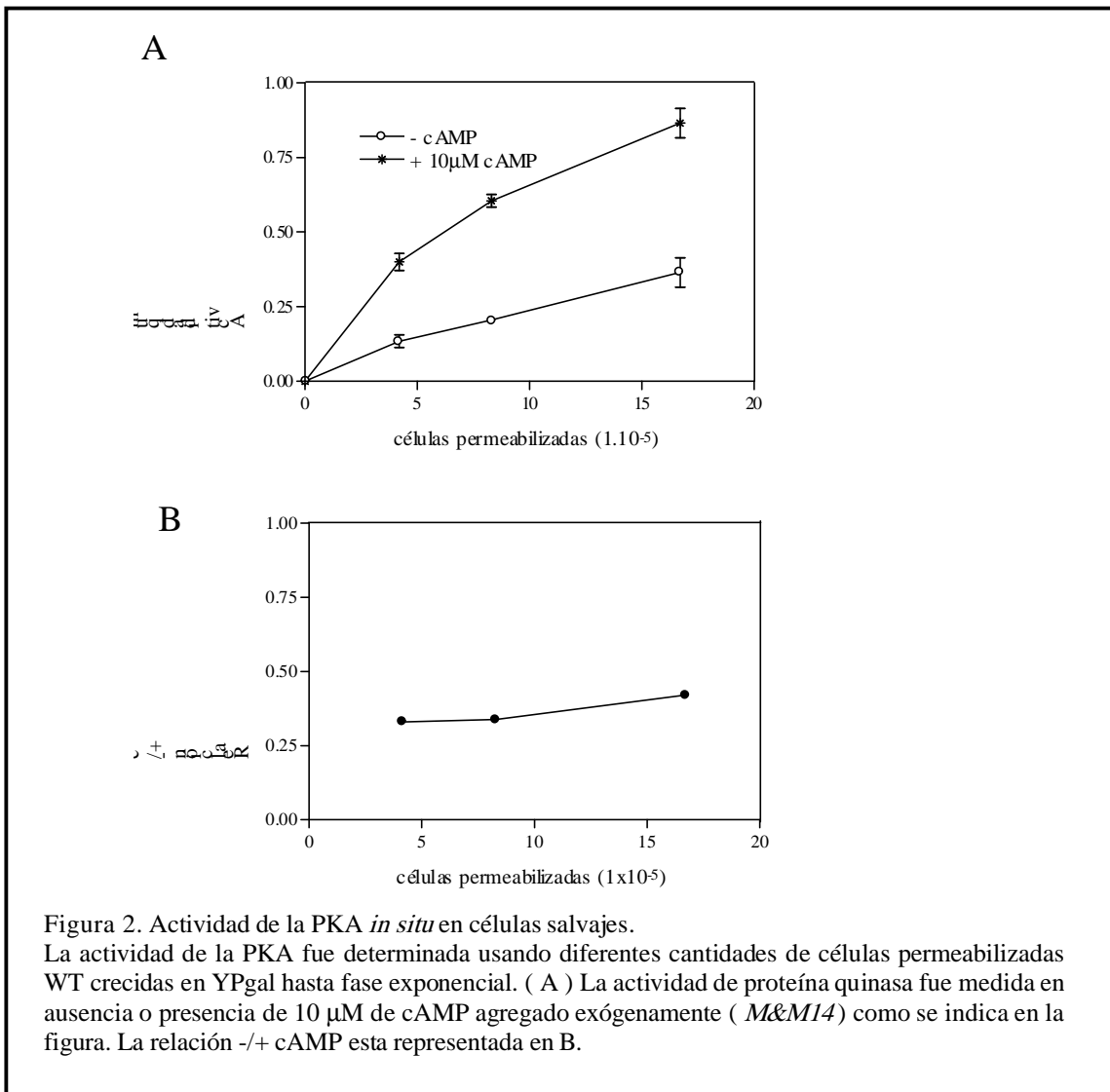
El ensayo de la actividad quinasa determinada *in situ* utilizando un sustrato exógeno, como el kemptido, refleja el comportamiento de la PKA en su contexto natural dentro de una única célula. Bajo estas condiciones, se conserva la concentración de la proteína quinasa y la interacción de ésta con otras proteínas. Por consiguiente, la relación  $-/+$  cAMP debería ser reflejo del estado de activación en una célula individual y ser, por lo tanto, independiente del número de células utilizadas en el ensayo.

La actividad quinasa fue determinada utilizando diferentes cantidades de células permeabilizadas de la cepa WT, en ausencia o presencia de cAMP 10  $\mu$ M agregado exógenamente (Figura 2 A). La relación  $-/+$  cAMP resultó constante, alrededor de 0.3-0.4 (Figura 2B). Definimos, entonces, a la actividad medida en células permeabilizadas en ausencia de cAMP agregado exógenamente como actividad PKA “end ógena”.

El siguiente esquema representa el proceso de permeabilización, las condiciones en las cuales se determinan la actividad quinasa *in situ* + cAMP 10 $\mu$ M y la actividad endógena.



En un trabajo previo del grupo de la Dra. Moreno ( Sorol *et al.*, 2001), se demostró en células permeabilizadas de *Mucor rouxii*, que la actividad total de la PKA estimada en ensayos *in situ* resultó aproximadamente siete veces menor que la estimada de ensayos *in vitro* usando extracto crudos. La actividad *in situ* detectada en presencia de cAMP aumentó por al agregado de NaCl o por policonaciones, dos compuestos que favorecen la disociación de la PKA de *M. rouxii*.



Cuando estimamos la actividad total de la PKA por células WT utilizando los datos de la Figura 1 y 2, concluimos que la actividad total (+ cAMP) determinada en los ensayos *in vitro* es 10-20 veces mayor que la actividad quinasa determinada *in situ* (dato no mostrado). Esta diferencia indica que, no toda la actividad dentro de la célula puede ser activada utilizando células permeabilizadas.

#### Correlación entre la actividad quinasa y fenotipos controlados por PKA

Con el objetivo de investigar si la actividad y el grado de activación de la PKA, determinado en células permeabilizadas, pueden ser tomado como un reflejo del estado de activación endógena de la PKA *in vivo*, medimos la actividad de la PKA *in situ* en células que presentan diferencias significativas para fenotipos clásicos dependientes de PKA.

Para investigar si existe una correlación entre fenotipos dependientes de PKA y la actividad de esta enzima, se utilizaron cuatro cepas con diferentes fondos genéticos: WT, 14, WTBCY y 14bcy (ambas cepas sobreexpresan su respectivo alelo clonado en Yep51, ver tabla de cepas utilizadas en este capítulo). Cuando se analizan diferentes fenotipos dependientes de PKA, estas cepas pueden ordenarse de menor a mayor severidad: WTBCY < WT < 14bcy < 14 (Portela et al, 2001). La cepa 14 tiene una delección que comprende la los residuos G284-L297 (segmento que comprende la región  $\alpha$  hélice-C) provocando mayor actividad quinasa y mayor severidad en los fenotipos dependientes de PKA cuando se compara con la cepa salvaje.

La sobreexpresión del alelo salvaje como del mutante no provocan un incremento concomitante de las subunidades catalíticas. Las diferencias fenotípicas observadas en cada cepa es consecuencia de la actividad quinasa que resulta del desplazamiento del equilibrio asociación/disociación hacia la asociación, como consecuencia de la sobreexpresión o no de los respectivos alelos (Zaremborg et al, 1996 y Portela et al, 2001).

Cepas sobreexpresando o no sus correspondientes subunidades R, se crecieron en presencia de galactosa como fuente de carbono, las cuales fueron utilizadas para determinar fenotipos y la actividad *in situ* de PKA. La Figura 3 A muestra el crecimiento de las cepas WTBCY, 14bcy y sus respectivas cepas control, WT y 14, sobre medio selectivo con galactosa como fuente de carbono. La viabilidad en fase estacionaria de crecimiento fue estimada como %

de células viables, determinada por la capacidad de formar colonias sobre YPgal agarizado: WTBCY: 100%, WT: 74%, 14bcy: 17% y 14: 6%.

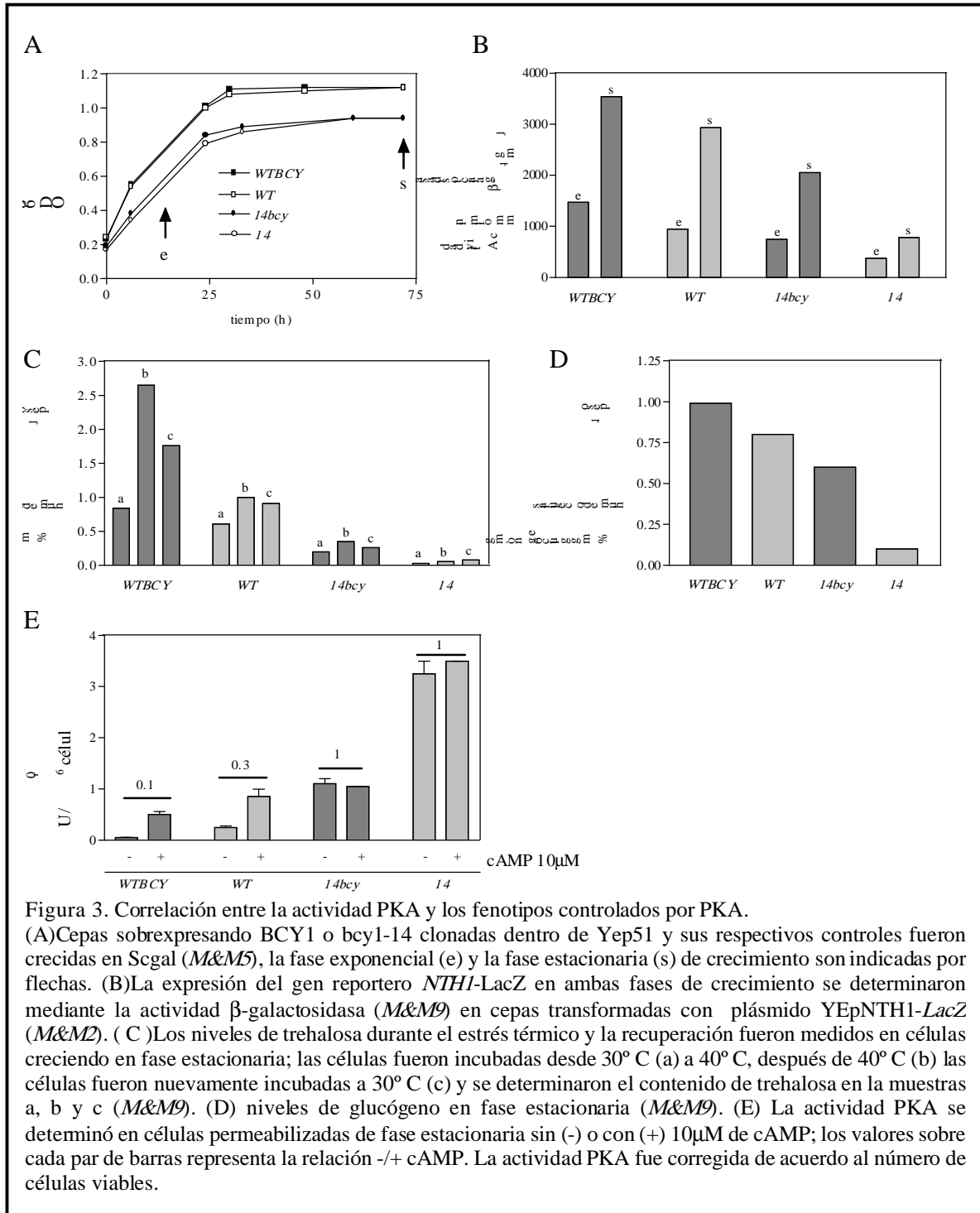


Figura 3. Correlación entre la actividad PKA y los fenotipos controlados por PKA.

(A) Cepas sobrexpresando BCY1 o bcy1-14 clonadas dentro de Yep51 y sus respectivos controles fueron crecidas en Scgal (*M&M5*), la fase exponencial (e) y la fase estacionaria (s) de crecimiento son indicadas por flechas. (B) La expresión del gen reportero *NTH1-LacZ* en ambas fases de crecimiento se determinaron mediante la actividad  $\beta$ -galactosidasa (*M&M9*) en cepas transformadas con plásmido YEpNTH1-*LacZ* (*M&M2*). (C) Los niveles de trehalosa durante el estrés térmico y la recuperación fueron medidos en células creciendo en fase estacionaria; las células fueron incubadas desde 30° C (a) a 40° C, después de 40° C (b) las células fueron nuevamente incubadas a 30° C (c) y se determinaron el contenido de trehalosa en la muestras a, b y c (*M&M9*). (D) niveles de glucógeno en fase estacionaria (*M&M9*). (E) La actividad PKA se determinó en células permeabilizadas de fase estacionaria sin (-) o con (+) 10  $\mu$ M de cAMP; los valores sobre cada par de barras representa la relación -/+ cAMP. La actividad PKA fue corregida de acuerdo al número de células viables.

La viabilidad en fase exponencial de crecimiento fue 100% para todas las cepas.

Se determinó también la inducción de la expresión de la trehalasa neutra, codificada por el gen *NTH1*, usando un plásmido con un gen reportero YEp*NTH1*-LacZ. El promotor del gen *NTH1* contiene varios elementos STRE (STress Responsive Element). La unión de los factores de transcripción Msn2p y Msn4p a elementos STRE son regulados negativamente por cAMP (Görner *et al*, 1998).

La inducción de la transcripción fue cuantificada por la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en muestras tomadas en fase de crecimiento exponencial y estacionario (indicada por flechas en la Figura 3 A).

Se sabe que la expresión de *NTH1* es baja en células creciendo en glucosa, comienza a aumentar durante el crecimiento diauxico y permanece alta durante la fase estacionaria (Zähringer *et al*, 1998 y Parrou *et al*, 1999). En cepas crecidas en presencia de galactosa como fuente de carbono el nivel de expresión del gen reportero fue dependiente de la fase de crecimiento, en (Figura 3 B). Cuando se compara el nivel de expresión de las distintas cepas, tanto durante la fase de crecimiento exponencial como estacionaria, puede observarse el siguiente orden: WTBCY >BCY >14bcy >14.

Se conoce que los niveles de trehalosa son regulados potentemente por la PKA. Mutantes con actividad PKA alta son defectuosas en acumular trehalosa, tanto en fase estacionaria o en condiciones de estrés (Cameron *et al*, 1988). El glucógeno, un carbohidrato de reserva, es sintetizado durante la fase exponencial del crecimiento sobre glucosa y es degradado junto con la trehalosa durante el re-inicio de crecimiento sobre glucosa; así como durante el crecimiento en ausencia de fuente de carbono. Se observa una relación inversa donde, actividad de PKA alta inhibe la acumulación de glucógeno (Cameron *et al*, 1988). Se analizó el nivel de trehalosa durante estrés térmico y su recuperación, así como los niveles de glucógeno en células crecidas hasta fase estacionaria. En la Figura 3 C se puede observar, que los niveles de trehalosa durante el estrés térmico decrecen gradualmente en el orden WTBCY > BCY > 14bcy > 14. El contenido de glucógeno presentó un patrón similar (Figura 3 D).

En resumen, los resultados de la Figura 3 (B-D) indican que la severidad de los diferentes fenotipos dependientes de PKA puede ser ordenada de la siguiente forma: WTBCY < BCY



< 14bcy < 14. Este orden concuerda con resultados previos, en los cuales los mismos fenotipos fueron analizados cualitativamente (Portela *et al*, 2001).

Para investigar la correlación entre el estado de activación de la PKA *in vivo* y el grado de severidad de los fenotipos dependientes de PKA, se determinó la actividad PKA *in situ*.

Para esto, se ensayó la actividad enzimática de PKA utilizando células permeabilizadas. La Figura 3 E muestra la actividad de la PKA determinada en células permeabilizadas usando kemptido como sustrato en ausencia o presencia de 10 $\mu$ M de cAMP exógeno (ver esquema del proceso de permeabilización).

Existen tres posibles maneras de analizar la correlación entre actividad *in situ* versus fenotipos dependientes de PKA:

1) comparar la actividad medida en ausencia de cAMP agregado exógenamente: este parámetro es el que mejor correlaciona con los fenotipos determinados. El incremento gradual en la actividad PKA “en dógena” desde WTBCY hasta 14 es acompañado por una disminución proporcional en la acumulación de trehalosa y glucógeno, así como en la expresión del gen reportero.

2) comparar la actividad medida en presencia de cAMP exógeno: este valor no presenta una buena correlación, especialmente respecto del comportamiento de la mutante, donde se observó independencia frente al cAMP.

3) usar la relación -/+cAMP: este parámetro está afectado por los valores del punto 2, como se observa al analizar las cepas 14 y 14bcy, donde cada una presenta diferente severidad fenotípica y la misma actividad -/+ cAMP:1.

Dado que estos experimentos fueron realizados en presencia de galactosa como fuente de carbono, y con el objetivo de extender este análisis, se subclonaron las subunidades regulatorias salvaje y bcy1-14 en el vector p425-GPD (*M&M2*). La expresión de los genes bajo este promotor es independiente de la fuente de carbono, de manera que permitió el análisis en galactosa y en glucosa. La sobreexpresión de la subunidad R bajo control del promotor *GPD1* se evaluó por inmunoblot utilizando un anticuerpo anti-BCY1 y por la capacidad de unión a [<sup>3</sup>H]-cAMP. La sobreexpresión resultó alrededor de 70 veces mayor para ambas variantes de R (resultado no mostrado).

El análisis de fenotipos dependientes de PKA realizados sobre medio YPglu agarizado, indicaron que la sobreexpresión del gen BCY1, en su forma salvaje o mutada *bcy1-14* bajo el control del promotor *GPD1*, no provocó cambios en la acumulación de glucógeno en células creciendo en glucosa. A pesar de este comportamiento, resultó interesante analizar, si la falta de cambio en el fenotipo dependiente de PKA también correlacionaba con la medición de la actividad de PKA *in situ*.

Se determinaron los niveles de trehalosa y glucógeno en células creciendo en fase estacionaria (resultado no mostrado). Como era de esperar, el contenido de ambos carbohidratos fue menor para la cepa *bcy1-14*. La sobreexpresión de cada subunidad R en el fondo genético correspondiente, no provocó una disminución en la severidad de los fenotipos dependientes de PKA analizados. Además se determinó la actividad PKA *in situ* utilizando células permeabilizadas (resultado no mostrado).

Nuevamente, la mejor correlación entre el orden fenotípico de las cepas y la actividad PKA (WTBCY = WT < 14bcy = 14) resultó al comparar la actividad “en dógena”.

Se realizaron experimentos utilizando cepas transformadas con la subunidad R salvaje o mutante bajo el promotor *GPD* pero en presencia de galactosa como fuente de carbono, los cuales resultaron similares al comportamiento sobre glucosa. Cualquiera sea la causa de la diferencia entre las células que sobreexpresan la subunidad R utilizando los diferentes plásmidos, la correlación entre la actividad “en dógena” de la PKA ensayada en ausencia de cAMP en células permeabilizadas y los fenotipos observados *in vivo* fue consistente en los dos casos. Estos resultados indican que la determinación de la actividad PKA endógena permite una buena estimación de la actividad *in vivo* de la PKA dentro de la célula.

Además de estos resultados, puede observarse que la actividad PKA endógena de las células salvajes creciendo sobre galactosa y glucosa fue mayor durante la fase exponencial de crecimiento ( $1.4 \pm 0.2$  U/ $1.10^6$  células para galactosa, y  $1.7 \pm 0.2$  U/ $1.10^6$  células para glucosa) y menor en fase estacionaria ( $0.20 \pm 0.05$  U/ $1.10^6$  células para galactosa, y  $0.5 \pm 0.04$  U/ $1.10^6$  células para glucosa). Este resultado muestra que tanto con glucosa como galactosa, la actividad de la PKA cae durante la transición desde fase exponencial a la fase estacionaria. A través del comportamiento de los fenotipos dependientes de PKA, se ha descrito que en levaduras la actividad de PKA debería disminuir durante el crecimiento

diauxico y mantenerse baja durante la fase estacionaria (Thevelein *et al*, 1992; 1994 y Tachell *et al*, 1993). Nuevamente, la determinación de la actividad endógena de la PKA correlaciona con los fenotipos, confirmando el comportamiento de la actividad quinasa durante el crecimiento.

### 1.3) Discusión.

En este capítulo demostramos que las determinaciones de la actividad *in vitro* de la PKA en presencia de cAMP utilizando extractos crudos pueden dar una estimación del nivel total de la quinasa. Este valor es importante mientras represente la máxima actividad que puede alcanzar el sistema. Aún así, este abordaje no da ningún dato acerca del grado de activación de la holoenzima dentro de la célula, debido al efecto que provoca la concentración de proteínas de los extractos crudos sobre el estado de disociación de la holoenzima.

Los resultados presentados aquí mostraron que la relación  $-/+$  cAMP es dependiente de la concentración de proteínas empleadas en el ensayo.

De todas maneras, aún si la concentración de cAMP usada en los experimentos *in vitro* fuera similar a la concentración que afecta la actividad de la PKA dentro de la célula este método no reflejaría exactamente la actividad de la enzima *in vivo*, principalmente por el efecto de la concentración sobre el equilibrio de disociación.

Hemos utilizado el ensayo *in situ* para determinar la actividad de la PKA en *S.cerevisiae* empleando células permeabilizadas. Este procedimiento controla el entorno iónico y metabólico celular preservando la concentración proteica presente *in vivo*, así como los compartimentos intracelulares y la relación endógena entre proteínas quinasas y fosfatasas respecto de sus sustratos. Un beneficio adicional, al utilizar este abordaje, es que se conserva la concentración celular de la proteína en estudio, así como la concentración de proteínas totales.

Sin embargo, pensamos que como consecuencia de lo anterior, este ensayo no permite medir la cantidad total de la actividad de la PKA dentro de las células, aún en presencia de cAMP. La actividad determinada en células permeabilizadas en presencia de cAMP fue mucho menor que la determinada en extractos crudos obtenidos de las mismas células. Aparentemente, en células permeabilizadas, no toda la PKA está accesible a la activación por cAMP exógeno, un fenómeno descrito previamente usando el mismo abordaje experimental en el hongo *Mucor rouxii* (Sorol *et al*, 2001).

Como se observó en la Figura 3, la actividad *in situ* + cAMP no mostró correlación con los fenotipos analizados.

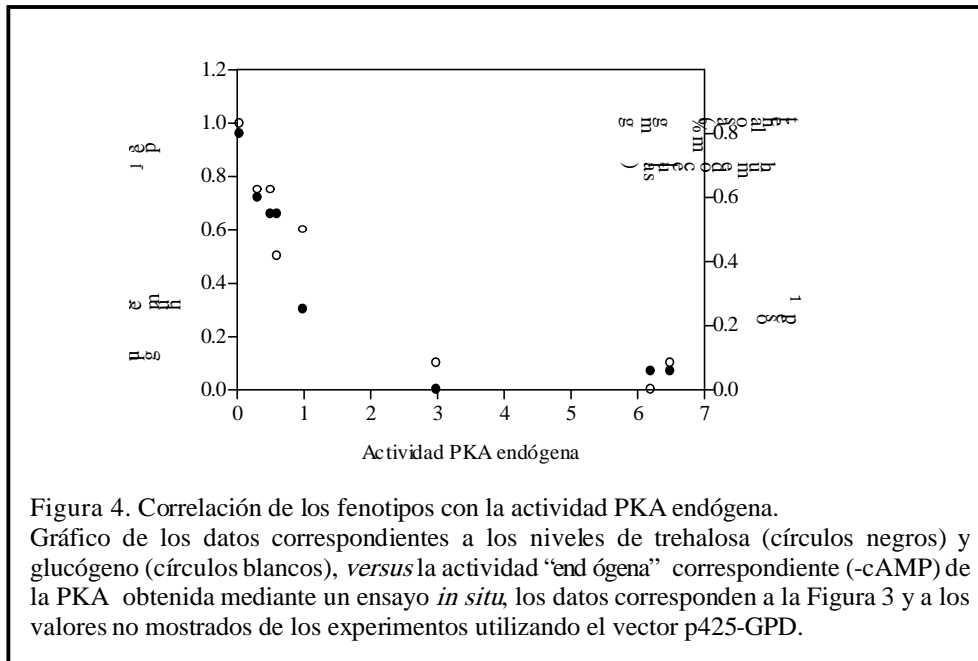
Es importante puntualizar, para la interpretación de estos resultados, que la caracterización bioquímica de la mutante *bcy1-14* indicó que ésta es capaz de interactuar con C (aunque con menor afinidad), pero genera una holoenzima mutante parcialmente activa, incapaz de ser activada por cAMP (Zaremborg V., tesis doctoral). Esta mutante posee una delección que abarca los residuos G284-L297 que corresponde a la  $\alpha$ -hélice en la región carboxilo terminal del sitio A de unión al cAMP, el cual coordina varias funciones: unir C con alta afinidad (junto con el sitio de pseudosustrato) y estabilizar  $\alpha$ -hélices y láminas  $\beta$  del dominio A de unión al cAMP. Esto podría explicar la independencia frente al cAMP de la cepa mutante con o sin sobreexpresión, hecho que anula la correlación de este parámetro y los fenotipos entre todas las cepas utilizadas en este estudio.

Es importante notar, que la actividad quinasa "generada" por el agregado de cAMP exógeno no refleja la actividad *in vivo* en las diferentes cepas, debido a que los niveles de quinasa son consecuencia del tipo de alelo de R que se está sobreexpresando o no, de la afinidad relativa de la proteína mutante respecto de C y de la capacidad de respuesta al cAMP exógeno agregado.

Por otro lado, utilizando este modelo experimental, encontramos que la actividad basal de la PKA medida en ausencia de cAMP, agregado exógenamente a las células permeabilizadas, correlaciona muy bien con la intensidad de los fenotipos dependientes de PKA.

Denominamos a esta actividad "endógena", ya que parecería reflejar el estado de activación de la PKA intracelular en el momento del proceso de permeabilización.

La Figura 4 ilustra la correlación de la actividad "endógena" de la PKA con los niveles de trehalosa y glucógeno.



La actividad *in vivo* de la PKA ha sido siempre difícil de estimar, es por esto que la determinación de la actividad utilizando células permeabilizadas podría ofrecer un abordaje conveniente para estimar la actividad PKA *in vivo*. Sería una poderosa herramienta para investigar si los cambios fenotípicos y/o bioquímicos generados por cambios transitorios en la ruta de transducción de señales vía cAMP en levaduras correlaciona con un incremento en la actividad de la PKA *in vivo*.



## Capítulo 2

Activación y fosforilación dependiente de glucosa de la Proteína Quinasa A en  
*Saccharomyces cerevisiae*



### 2.1) Introducción.

En *Saccharomyces cerevisiae*, la PKA controla diversos procesos celulares. Su activación estimula la glucólisis, permite una progresión rápida a través del ciclo celular, dispara la movilización de glucógeno y trehalosa, y media la represión transcripcional de los genes gluconeogénicos y aquellos relacionados con la resistencia al estrés (Thevelein y de Winde, 1999).

La glucosa es un potente activador de la síntesis de cAMP, señalizada a través de un receptor (Gpr1) acoplado a una proteína G (GPCR) en combinación con el sistema dependiente de la fosforilación de la glucosa (Rolland *et al*, 2002). Recientemente, Lemaire *et al*, 2004 han demostrado que Gpr1 sensa los azúcares por interacción directa con éstos. La glucosa y la sacarosa se unen con baja afinidad en el bolsillo de unión formado por los dominios transmembrana del receptor.

La PKA responde a fuentes de carbono fermentables, ya que el agregado de glucosa o sacarosa a células creciendo en una fuente de carbono no fermentable resulta en una acumulación de cAMP rápida y transiente a través de la estimulación de la adenilato ciclasa. Luego, los niveles de cAMP son rápidamente degradados por la fosfodiesterasa de cAMP de baja afinidad, a través de la vía de retroalimentación negativa estimulada por la misma PKA (Ma *et al*, 1999). Se ha establecido que, la señalización inducida por glucosa sería necesaria para una transición rápida desde el metabolismo respiratorio o la fase estacionaria de crecimiento hacia la fermentación (Jiang *et al*, 1998; Kraakman *et al*, 1999). Si bien los cambios en los fenotipos dependientes de PKA en respuesta a glucosa han sido bien estudiados, no existen reportes en la literatura acerca de la determinación de la actividad de la PKA durante la estimulación de la vía del cAMP.

La determinación de la actividad de la PKA, dentro del complejo contexto intracelular, requiere métodos que reflejen el comportamiento de la enzima en su entorno natural dentro de la célula, preservando la interacción con otras proteínas y su localización. De este modo, como hemos descrito en el Capítulo 1, la actividad endógena de la PKA (determinada en células permeabilizadas en ausencia de cAMP agregado exógenamente) presentó una buena correlación con los fenotipos dependientes de PKA determinados *in vivo*.

Muchas proteínas quinasas además de fosforilar proteínas blanco, son fosfoproteínas y tanto su función biológica como su actividad esta regulada por la fosforilación. Muchas de ellas requieren de la fosforilación de residuos dentro del segmento de activación, mientras que otras requieren múltiples eventos de fosforilación tanto en el segmento de activación como en sitios alostéricos. Se ha descrito que la subunidad catalítica de la PKA de mamíferos es fosforilada en residuos específicos los cuales tienen influencia sobre el ensamblado de una enzima activa y/o sus propiedades cinéticas (Moore *et al*, 2002). Sin embargo no se conoce el mecanismo *in vivo* de la fosforilación, específicamente acerca del efector que media dicho cambio.

En este capítulo describimos la activación *in vivo* de la PKA durante la transición del metabolismo respiratorio al fermentativo, midiendo actividad quinasa + cAMP en células permeabilizadas. La reconfiguración del metabolismo implica un incremento transiente de la actividad PKA con un cambio en el estado de fosforilación de Tpk1p. Observamos que la activación de PKA es dependiente de una máxima estimulación de la vía cAMP. El estado de fosforilación de la PKA depende de su actividad y cambios en el grado de fosforilación dependen de su activación evocada por el agregado de glucosa. Estudios cinéticos preliminares indican que la fosforilación incrementa la constante de especificidad de Tpk1p hacia el kemptido. Por último, se observó que la fosforilación de Tpk1p correlaciona con la presencia de fuente de carbono fermentable.

Cepas utilizadas en este capítulo.

| Nomenclatura       | Descripción | Fenotipo principal   |
|--------------------|-------------|--|
| 1115WT             | KT1115      | Cepa salvaje, proteólisis proteica general baja  |
| W303WT             | W303        | Cepa salvaje.  |
| SP1WT              | SP1         | Cepa salvaje.  |
| TPK1BCY1           | S7-7 A      | Cepa que sólo posee el alelo TPK1. Posee el gen de BCY1                                  |
| Gpr1Δ              | LK41        | Cepa que carece del receptor Gpr1, acoplado a proteína G                                 |
| TPK1bcy1           | TPK1bcy1    | Cepa que sólo posee el alelo TPK1. Carece del gen de BCY1, actividad quinasa desregulada |
| Tpk1 <sup>w1</sup> | RS13-58 A-1 | Cepa que posee mutado el alelo TPK1, baja actividad quinasa.                             |
| 35,2,m2/4          | 35,2,m2/4   | Cepa que carece de actividad adenilato ciclasa, no produce cAMP.                         |

## 2.2) Resultados.

Actividad de PKA *in situ* durante la señalización inducida por glucosa.

El primer objetivo fue determinar si los cambios bioquímicos y/o fenotípicos relacionados con cambios en la vía de transducción de señales cAMP-PKA correlacionan con un incremento en la actividad *in vivo* de la PKA.

Para esto, determinamos los niveles de cAMP, la actividad *in situ* de la PKA y el estado de fosforilación de un sustrato endógeno durante el incremento intracelular de los niveles de cAMP.

En primera instancia, para verificar la activación de la vía del cAMP bajo nuestras condiciones experimentales, se determinaron los niveles de cAMP después del agregado de 2% de glucosa a células que habían sido crecidas en glicerol hasta fase exponencial. Se utilizaron tres cepas salvajes con diferentes fondos genéticos (1115WT, SP1WT y W303WT), en las cuales se observó una acumulación máxima de cAMP alrededor de los 1-2 min luego del agregado de glucosa (Figura 1 y resultado no mostrado).

Luego se determinó la actividad *in vivo* de la PKA durante la señalización vía cAMP inducida por glucosa utilizando células permeabilizadas de levaduras con kemptido como sustrato en ausencia de cAMP exógeno. La actividad quinasa endógena de la cepa 1115WT varió a lo largo del tiempo con un valor máximo a 2.5-3 min luego del agregado de glucosa

y mostrando una correlación temporal con el pico de cAMP (Fig. 1B izquierda, curva –cAMP). Sin embargo, en la cepa *SPIWT* (Fig. 1 derecha; curva –cAMP) y en la cepa *W303WT* (resultado no mostrado) la actividad de la PKA fue siempre menor al nivel de detección del ensayo por lo que no se detectaron cambios durante los 15 min posteriores al agregado de glucosa.

Una explicación posible para la diferencia del nivel endógeno de PKA detectado entre las diferentes cepas puede residir en el hecho que la cepa *1115WT* contiene una deleción en el gen *PEP4* que provoca una disminución de la proteólisis general. Se sabe que la subunidad catalítica libre de la PKA es una proteína inestable (Rechsteiner y Rogers, 1996; Cantisani y Lopes, 2000), de manera que en esta cepa se espera mayor estabilidad de la subunidad catalítica disociada.

Los resultados observados en la Figura 1B indican que se produjo la activación de la PKA en respuesta a un incremento en los niveles de cAMP. Sin bien la actividad detectada fue muy baja, este resultado fue reproducible en varias repeticiones independientes realizadas.

Se determinó la actividad quinasa *in situ* en presencia de 10  $\mu$ M de cAMP (Figura 1B, +cAMP), el cual es agregado exógenamente durante el ensayo quinasa.

Los resultados indican que la actividad PKA aumentó conforme se incrementaron los niveles de cAMP intracelular, luego disminuyó rápidamente en el caso de la cepa *SPIWT* (Figura 1B derecha, +cAMP) y la cepa *W303* (resultado no mostrado); siendo esta disminución mas lenta para el caso de la cepa *1115WT*. Durante el diseño y realización de estos experimentos, sabíamos que la determinación de la actividad quinasa *in situ* (+cAMP) no detecta la actividad total de PKA intracelular; estimamos que en este se detecta alrededor de 20 veces menos que *in vitro* (utilizando extractos crudos + cAMP) (Capítulo 1). La tabla I ( ver discusión, página 87 ) muestra ejemplos de estas observaciones en las cepas *SPIWT* y *TPK1BCY1*.

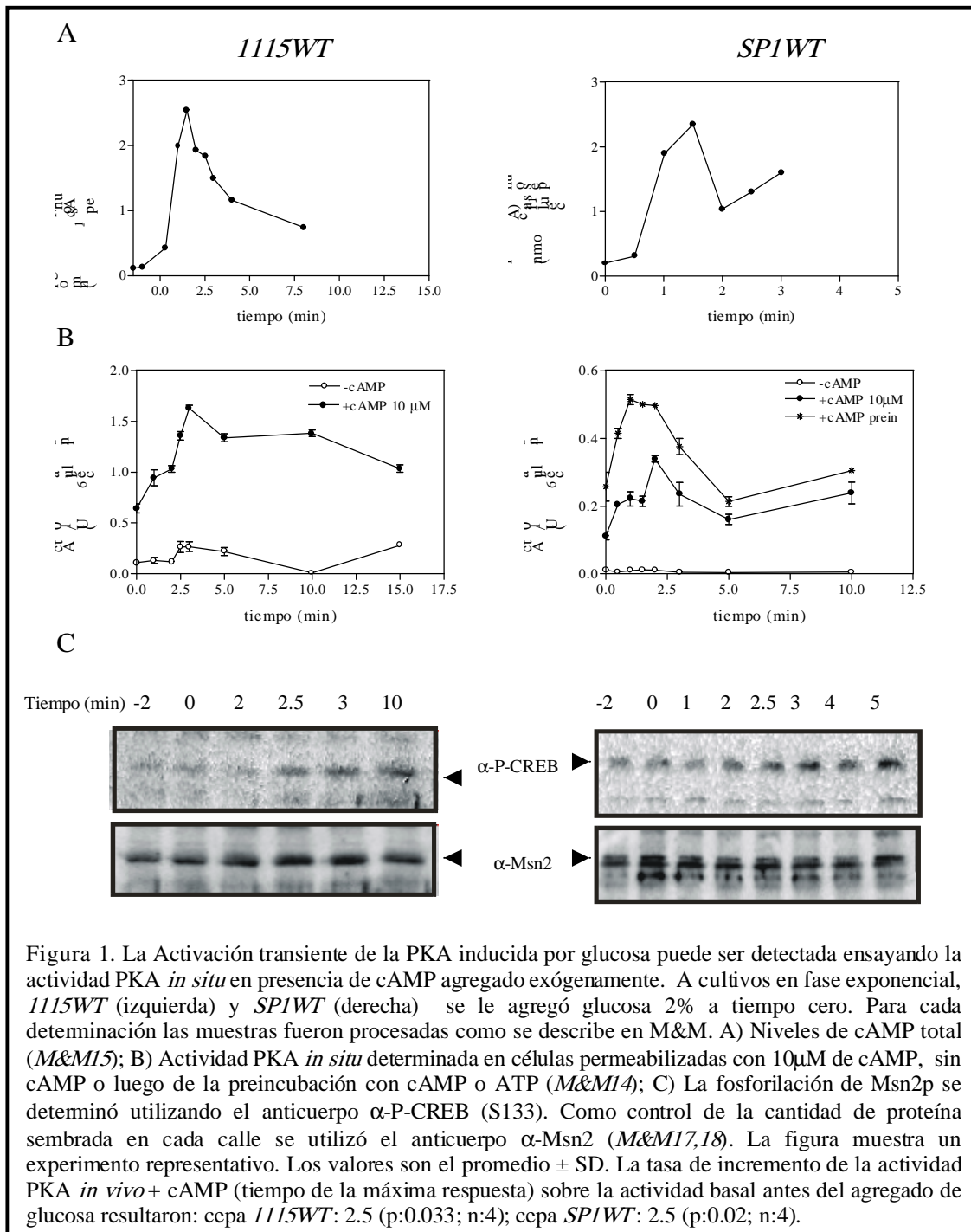


Figura 1. La Activación transiente de la PKA inducida por glucosa puede ser detectada ensayando la actividad PKA *in situ* en presencia de cAMP agregado exógenamente. A cultivos en fase exponencial, *1115WT* (izquierda) y *SPIWT* (derecha) se le agregó glucosa 2% a tiempo cero. Para cada determinación las muestras fueron procesadas como se describe en M&M. A) Niveles de cAMP total (*M&M15*); B) Actividad PKA *in situ* determinada en células permeabilizadas con 10 $\mu$ M de cAMP, sin cAMP o luego de la preincubación con cAMP o ATP (*M&M14*); C) La fosforilación de Msn2p se determinó utilizando el anticuerpo  $\alpha$ -P-CREB (S133). Como control de la cantidad de proteína sembrada en cada calle se utilizó el anticuerpo  $\alpha$ -Msn2 (*M&M17,18*). La figura muestra un experimento representativo. Los valores son el promedio  $\pm$  SD. La tasa de incremento de la actividad PKA *in vivo* + cAMP (tiempo de la máxima respuesta) sobre la actividad basal antes del agregado de glucosa resultaron: cepa *1115WT*: 2.5 (p:0.033; n:4); cepa *SPIWT*: 2.5 (p:0.02; n:4).

Es interesante notar que las diferencias en los niveles de quinasa detectados son menores en el punto que corresponde a la máxima concentración intracelular de cAMP (Tabla 1, relación T0 y Tmax).

La primera interpretación que surge de los resultados de la Figura 1 es que, el pico de actividad detectado en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de cAMP agregado exógenamente puede ser consecuencia de un estado de activación diferencial de las moléculas de holoenzima durante la señalización por cAMP. En otras palabras, resulta ‘mas fácil’ disociar a la PKA *in situ*, si ésta fue estimulada previamente con el cAMP intracelular.

Sin embargo, se tienen que descartar posibles artificios que podrían generar los resultados observados en la Figura 1B (curva +cAMP).

Las células cosechadas a 2-2.5 minutos luego del estímulo con glucosa estarían en contacto con el cAMP intracelular generado luego del estímulo, mientras que las de tiempo cero no.

El cAMP incorporado exógenamente es agregado simultáneamente con el kemptido y el ATP/Mg<sup>2+</sup> en la mezcla de ensayo, y ya que el tiempo de incubación para medir actividad quinasa es solo 3 minutos (ver *M&M14*), podría no ser suficiente para compensar la diferencia temporal frente al cAMP que presentan las muestras cosechadas a los diferentes tiempos.

El segundo se desprende del conocimiento que el agregado de glucosa causa una caída transiente en el nivel de ATP intracelular, la cual coincide con una síntesis rápida de los azúcares fosfatos (Thevelein *et al*, 1987b). Esta diferencia en la concentración intracelular de ATP podría provocar una proporción diferente de moléculas PKA-ATP/Mg<sup>2+</sup> producidas durante la caída transiente de ATP intracelular.

Para excluir estas dos posibilidades y para facilitar el proceso de activación realizamos el ensayo para determinar la actividad *in situ* en dos etapas: células permeabilizadas de la cepa *SPIWT* fueron preincubadas con una mezcla de ensayo conteniendo ATP, Mg<sup>2+</sup> y 10 $\mu\text{M}$  de cAMP durante 10 min. a 4° C (donde se permitió que el cAMP se una a la holoenzima y los niveles de ATP se equilibren), previo al agregado de kemptido. Como resultado, se observó mayor actividad con el mismo comportamiento de activación durante el estímulo (Figura 1B derecha, curva prein +cAMP).

Por último, otra razón que produzca el cambio de la actividad *in situ* +cAMP, es que el cAMP exógeno no se mantenga a igual concentración durante los 3 minutos de ensayo como consecuencia de una degradación por fosfodiesterasas activadas diferencialmente durante el estímulo con glucosa. Para probar esto, se agregó como trazador [<sup>3</sup>H]cAMP en la mezcla de reacción utilizada para determinar actividad PKA *in situ* (la reacción se realizó en dos etapas como se describió anteriormente). El [<sup>3</sup>H]cAMP remanente se determinó mediante los ensayos típicos utilizados para la medición de actividad fosfodiesterasa. Se observó solo una degradación de no más del 1% del cAMP exógeno a lo largo de los 10 minutos posteriores al estímulo con glucosa.

Luego de descartar estos posibles artificios, podemos sustentar la interpretación de los resultados obtenidos: la actividad detectada en presencia de cAMP exógeno podría ser consecuencia de un estado diferencial de activación de las moléculas de holoenzima durante la señal vía cAMP endógeno.

Además se determinó la actividad PKA (en presencia o ausencia de cAMP 10 μM) empleando extracto crudo y preparaciones semipurificadas de PKA a partir de muestras tomadas a diferentes tiempos, luego del agregado de glucosa a células crecidas en glicerol. No se observaron cambios significativos de la actividad PKA a lo largo del estímulo, tanto para la cepa *SPIWT* o *TPK1BCY1* (resultado no mostrado). Esto, demuestra nuevamente, que la determinación de la actividad PKA *in situ* correlaciona con la actividad *in vivo* (ver luego fosforilación de Msn2, Figura 1C).

Con el objetivo de investigar si la activación tiene consecuencias sobre los niveles de las subunidades de la PKA se analizaron los niveles de R y C por dos métodos: determinación de las actividades y por western-blot. Para obtener una relación directa entre el nivel de expresión y actividad de la subunidad catalítica, este experimento se realizó con una cepa que carece de los genes *TPK2* y *TPK3*, ya que solo contamos con anticuerpos contra la isoforma *TPK1*.

La cepa *TPK1BCY1* mostró una correlación similar entre los niveles de cAMP y la activación *in situ* de la PKA + cAMP (Fig 2 panel A y B) a la que presentaron las cepas salvajes (ver Fig 1). La Fig 2 C muestra que, luego del pico de cAMP, los niveles de subunidades Bcy1p y Tpk1p permanecen constantes. Podemos inferir entonces, que la

disminución de la actividad quinasa observada luego de los 5-10 min posteriores al agregado de glucosa es consecuencia del desplazamiento del equilibrio de reacción de la holoenzima hacia el estado asociado como consecuencia de la disminución de los niveles de cAMP intracelulares y no a una reducción en los niveles de subunidad C.

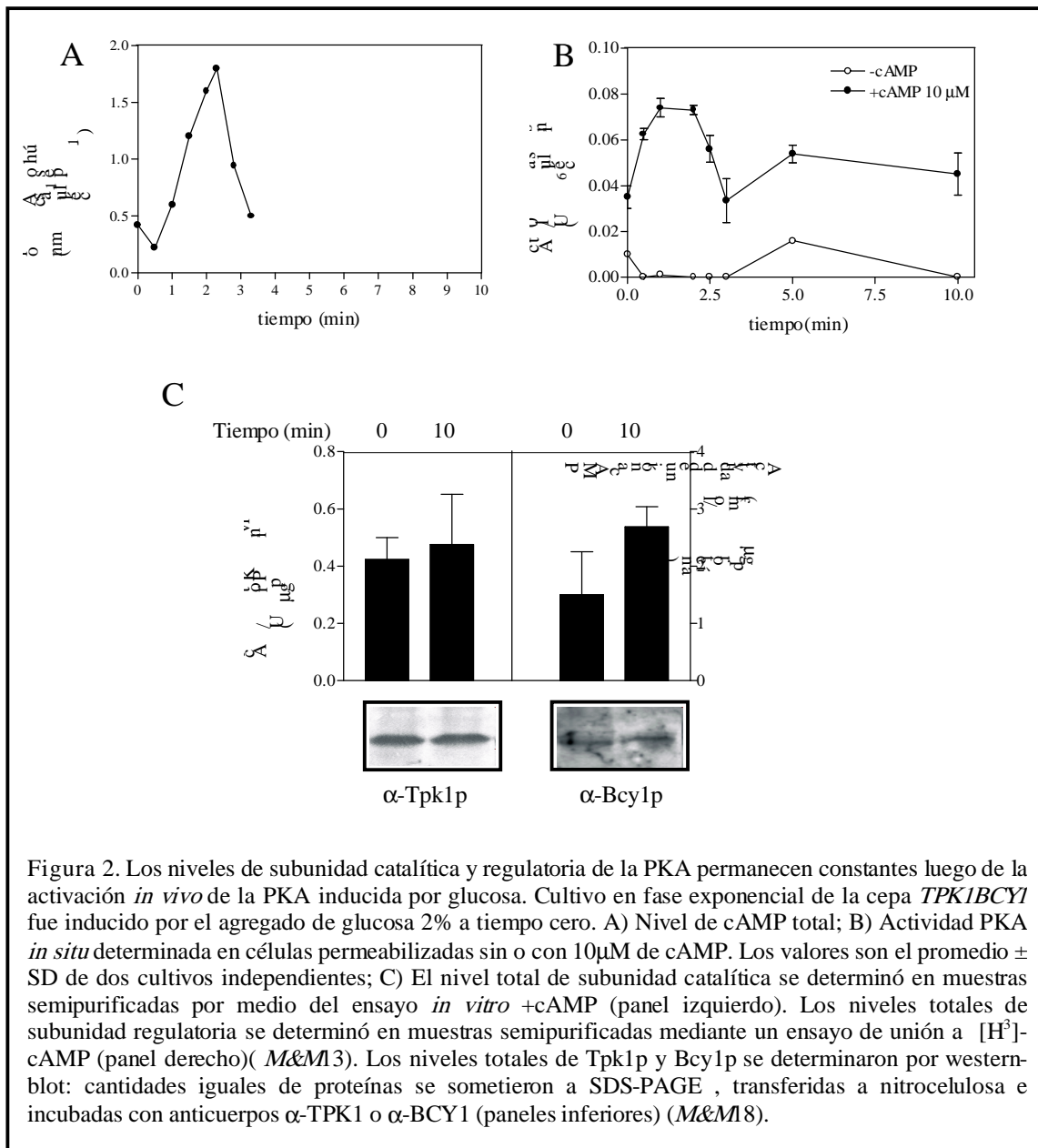


Figura 2. Los niveles de subunidad catalítica y regulatoria de la PKA permanecen constantes luego de la activación *in vivo* de la PKA inducida por glucosa. Cultivo en fase exponencial de la cepa *TPK1BCY1* fue inducido por el agregado de glucosa 2% a tiempo cero. A) Nivel de cAMP total; B) Actividad PKA *in situ* determinada en células permeabilizadas sin o con 10μM de cAMP. Los valores son el promedio ± SD de dos cultivos independientes; C) El nivel total de subunidad catalítica se determinó en muestras semipurificadas por medio del ensayo *in vitro* +cAMP (panel izquierdo). Los niveles totales de subunidad regulatoria se determinó en muestras semipurificadas mediante un ensayo de unión a [<sup>3</sup>H]-cAMP (panel derecho) (*M&M*3). Los niveles totales de Tpk1p y Bcy1p se determinaron por western-blot: cantidades iguales de proteínas se sometieron a SDS-PAGE, transferidas a nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos α-TPK1 o α-BCY1 (paneles inferiores) (*M&M*8).



Para detectar de una manera independiente la activación *in vivo* de la PKA seguimos el estado de fosforilación de un blanco directo de la quinasa durante el estímulo. Uno de ellos es el factor de transcripción Msn2 que es responsable de la expresión de los genes que responden al estrés, como *HSP1* y *SSA3*. Luego del agregado de glucosa a células en fase estacionaria de crecimiento, la expresión de éstos genes es apagada rápidamente, como consecuencia de la re-localización de Msn2 en citoplasma, proceso que es mediado por la PKA (Görner *et al*, 1998; Jacquet, 2003). Recientemente, se ha demostrado que la señal de localización nuclear (NLS) de Msn2p es modificada directamente por PKA *in vivo* e *in vitro* afectando su localización subcelular (Görner *et al.*, 2002).

Por lo tanto, determinamos el estado de fosforilación de Msn2p luego del agregado de glucosa a células salvajes crecidas en presencia de glicerol, por medio de western blot con anticuerpos anti-P-CREB (Görner *et al*, 2002). La Figura 1C muestra que el agregado de glucosa modifica el estado de fosforilación de Msn2p, aumenta a medida que los niveles de cAMP suben, pero permanece alto aún cuando los niveles del nucleótido cíclico decrecen. Este resultado indica que existió activación *in vivo* de la PKA en las cepas *1115WT* y *SPIWT* aún cuando los niveles de actividad PKA endógena no fueron detectados como es el caso de la cepa *SPIWT*.

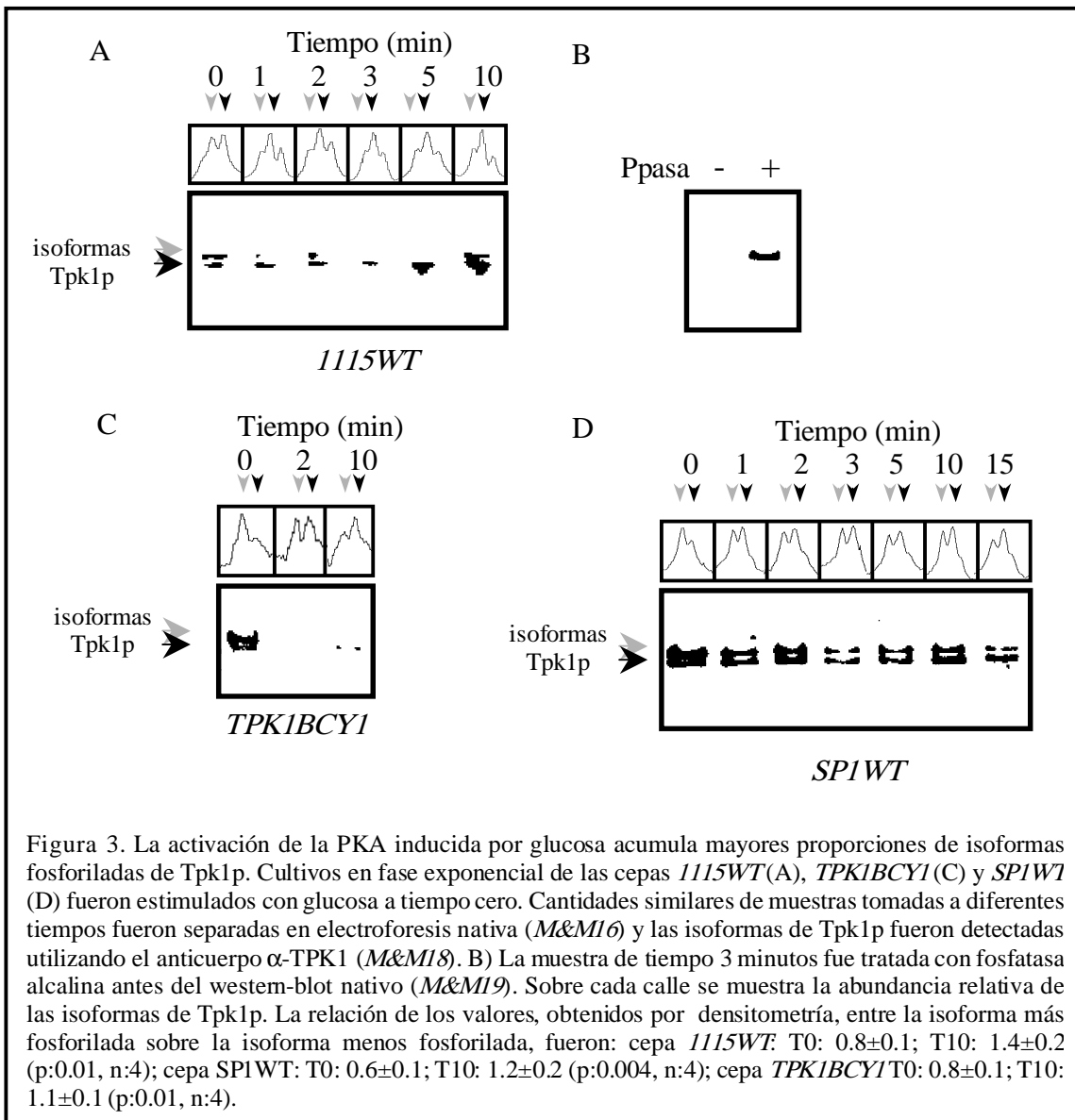
Concluyendo, la correlación temporal entre los niveles de cAMP, actividad *in situ* (+cAMP) y la fosforilación *in vivo* de una proteína blanco de la PKA (Fig 1), indican que la activación endógena de la PKA disparada por el aumento de cAMP evocado por glucosa puede ser detectado *in situ* por el agregado de 10  $\mu$ M de cAMP.

Estado de fosforilación de Tpk1p durante la transición del metabolismo respiratorio al fermentativo.

La actividad de las proteínas quinasas es controlada por diversos mecanismos los cuales incluyen la interacción con otras subunidades o dominios que pueden funcionar en respuesta a segundos mensajeros, localización subcelular, fosforilación por quinasas o desfosforilación por fosfatasas (Johnson *et al*, 1996). El análisis en electroforesis bi-dimensional de la subunidad Tpk1p mostró la presencia de varias isoformas (Levin y

Zoller, 1990), indicando que esta proteína contiene varios puntos de regulación post-traduccional.

Los resultados de las Figuras 1 y 2 indican que la PKA presenta un estado de activación diferente durante el pico de cAMP disparado por glucosa, por lo que fue interesante analizar si la subunidad catalítica estaba sujeta a modificaciones post-traduccionales durante el estímulo.



El análisis vía western-blot SDS-PAGE utilizando un anticuerpo anti-Tpk1p, de extractos crudos preparados de células creciendo en glicerol expuestas a glucosa (Figura 2C, panel izquierdo para la cepa *TPK1BCY1* y resultado no mostrado para *SPIWT*), no reveló ni en las muestras de 0 min y 10 min, la presencia de una sola isoforma de Tpk1p. Sin embargo, muestras de extractos crudos de diferentes cepas salvajes sometidas a electroforesis PAGE-nativo seguido por western-blot (*M&M16*) (Fig 3 A, D, calle 0 min; resultado no mostrado para *W303WT* y *TPK1BCY1*) reveló la presencia de al menos dos isoformas de Tpk1p. La masa molecular nativa de las isoformas con menor y mayor movilidad fue de 50 kDa. No se detectaron bandas cuando se utilizaron extractos crudos de la cepa *TPK2tpk1Δtpk3ΔBCY1*, indicando que las isoformas detectadas corresponden a monómeros de Tpk1p.

Debido a que la cantidad total de subunidad catalítica detectada en los geles nativos, cuantificadas por análisis de imágenes, no varía durante el estímulo las isoformas de Tpk1p detectadas no corresponden a las subunidades C generadas *in vivo*.

Es posible que la Tpk1p detectada sea producto de la disociación espontánea de la holoenzima debido a la dilución durante la preparación de extracto crudo y el buffer pH:9 (tratamiento de las muestras en la electroforesis nativa).

El tratamiento previo de las muestras con fosfatasa alcalina provoca un cambio en el patrón de migración observado previamente (Figura 3B), provocando la disminución de la migración de las isoformas con mayor movilidad. Es de notar, que la reducción en la movilidad de la isoforma “más rápida” produjo un incremento en la intensidad de la banda inmunoreactiva, la cual correspondería a la suma de las dos isoformas detectadas previo al tratamiento con fosfatasa alcalina (comparar Figura 3B calle -, + PPasa). Esos resultados indican que la modificación en el patrón de migración es consecuencia de la fosforilación de Tpk1p. La movilidad que presenta la isoforma menos fosforilada y la isoforma detectada luego del tratamiento con fosfatasa son iguales, lo que puede sugerir que la primera es resistente al tratamiento con la fosfatasa, o que ésta corresponde a una isoforma no fosforilada de Tpk1p.

Se determinó el estado de fosforilación de Tpk1p luego del agregado de glucosa a células creciendo en glicerol. Puede observarse, en las tres cepas salvajes analizadas (Figura 3 A, D y resultado no mostrado para *W303WT*) así como en la cepa *TPK1BCY1* (Figura 3C), que la

abundancia relativa de las isoformas de Tpk1p cambia desde mayor abundancia para la isoforma de menor movilidad a tiempo 0 hacia mayor abundancia de la isoforma de mayor movilidad a 10-15 min. La relación de los valores obtenidos del análisis densitométrico de la isoforma más fosforilada/la isoforma menos fosforilada obtenida para las tres cepas salvajes analizadas y la cepa *TPK1BCY1* resultó aproximadamente 0.6-0.8 a tiempo 0 (antes

del agregado de glucosa) y 1.1-1.4 a tiempo 10 minutos (post estímulo) (ver leyenda Figura 3). El análisis de Bcy1p por medio de electroforesis nativa y western-blot reveló la presencia de una sola banda (peso molecular nativo: 90 kDa, la cual corresponde al dímero de R) sin cambio en la cantidad total o en el patrón de migración durante el estímulo por glucosa (resultado no mostrado).

Como conclusión, observamos una correlación entre la cinética de la activación *in vivo* de la PKA por glucosa y el aumento de la fosforilación en Tpk1p, lo que sugiere que el cambio en el estado de fosforilación de la subunidad catalítica es consecuencia de la activación de la PKA.

Análisis de las isoformas de *Tpk1p* y de la actividad quinasa *in situ* en cepas mutantes de PKA.

Los resultados presentados en la Figura 3 sugieren una relación causal entre activación y fosforilación de PKA. Para probar esta hipótesis estudiamos si existe una correlación entre actividad quinasa y estado de fosforilación de Tpk1p en cepas con baja, intermedia y alta actividad PKA.

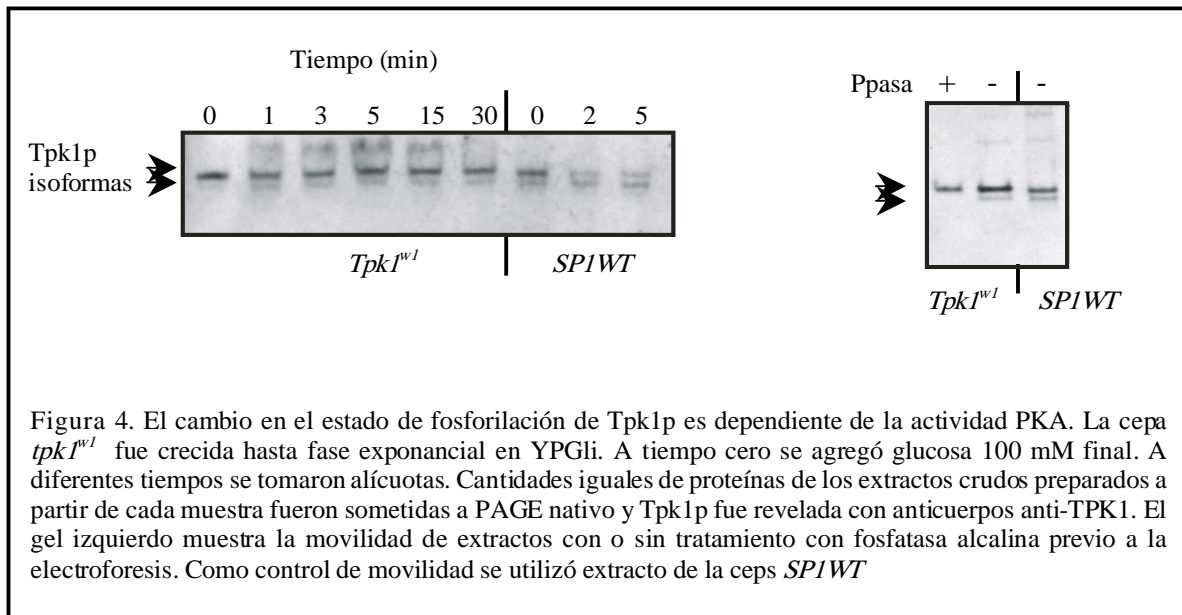


Figura 4. El cambio en el estado de fosforilación de Tpk1p es dependiente de la actividad PKA. La cepa *tpk1<sup>w1</sup>* fue crecida hasta fase exponencial en YPGli. A tiempo cero se agregó glucosa 100 mM final. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas. Cantidades iguales de proteínas de los extractos crudos preparados a partir de cada muestra fueron sometidas a PAGE nativo y Tpk1p fue revelada con anticuerpos anti-TPK1. El gel izquierdo muestra la movilidad de extractos con o sin tratamiento con fosfatasa alcalina previo a la electroforesis. Como control de movilidad se utilizó extracto de la ceps *SPIWT*

La cepa de levaduras *tpk1<sup>w1</sup>* posee actividad quinasa reducida. En esta cepa, dos de los genes TPK se encuentran anulados, mientras que el tercer gen *TPK1* se encuentra parcialmente inactivo, y como consecuencia, no se detecta actividad en extractos crudos o en células permeabilizadas (Cameron *et al*, 1988). Se ha descrito, que el agregado de glucosa a células no reprimidas de esta cepa provoca niveles de cAMP altos y persistentes (Mbonyi *et al*, 1990). El análisis por western-blot nativo de extractos crudos de células *tpk1<sup>w1</sup>* creciendo en glicerol mostraron dos isoformas de Tpk1p (Figura 4, calle 0 min), con mayor predominancia de la isoforma de menor movilidad. El tratamiento previo con fosfatasa alcalina de las muestras eliminó la banda correspondiente a la isoforma de mayor movilidad, indicando que esta isoforma se encuentra fosforilada ( Fig 4 panel derecho). La principal diferencia que presenta esta cepa respecto a una salvaje es que la proporción de ambas isoformas no cambia por el agregado de glucosa, manteniéndose constante hasta 30 min post agregado de glucosa (Figura 4). Este resultado indica que en presencia de actividad PKA baja, el estado de fosforilación de Tpk1 es principalmente hacia isoformas menos fosforiladas y no se observan cambios durante el estímulo por glucosa.

La pequeña diferencia en la movilidad presentada por la mutante Tpk1, cuando es comparada con la cepa salvaje, podría ser atribuida a la diferencia en la conformación

proteica que provoca el cambio de la Leu<sup>217</sup>, presente en un bolsillo hidrofóbico, a un residuo hidrofílico Ser<sup>217</sup>.

La presencia de una baja proporción de isoforma mas fosforilada en *tpk1<sup>w1</sup>*, podría indicar que esta cepa contiene una actividad quinasa mínima (ver discusión). Se sabe que las cepas conteniendo deleciones en los tres genes de TPK no son viables, lo que sugiere estas mutantes deben poseer cierta actividad. De acuerdo con estos resultados, la cepa *cdc35pde2msn2/4Δ*, en la cual no se predice actividad PKA por ausencia de la adenilato ciclasa, solo presentó la isoforma de menor movilidad (resultado no mostrado).

Como ejemplo de una mutante con elevada actividad PKA, utilizamos la cepa *TPK1bcy1Δ*. Previamente se ha demostrado que en este tipo de cepas mutantes, cuya actividad quinasa es constitutivamente alta, los niveles de cAMP son muy bajos y su inducción se encuentra fuertemente reducida (Colombo *et al*, 1998).

Como se muestra en la Figura 5 A, la actividad PKA *in situ* permanece constante luego del agregado de glucosa como era de esperar para una cepa que carece de subunidad regulatoria. Luego se analizó el estado de fosforilación de Tpk1 a diferentes tiempos despues del agregado de glucosa. Se observó, a lo largo del estímulo, al menos dos bandas con mayor movilidad (Figura 5 B muestra un tiempo representativo) a diferencia de las isoformas presentes en la cepa *SPIWT*. El tratamiento con fosfatasa alcalina cambia la movilidad de todas las isoformas observadas como consecuencia de la desfosforilación, coincidiendo con la isoforma menos fosforilada observada en el resto de las cepas. Estos resultados indican que una cepa con actividad quinasa no regulada presenta isoformas hiperfosforiladas de Tpk1p.

Elegimos una cepa que presenta actividad intermedia de PKA, la cepa *16*. Esta cepa contiene un alelo mutado *bcy1-16*, el cual comprende una deleción de todo el dominio B de unión a cAMP. Como consecuencia, esta cepa presenta fenotipos dependientes de PKA intermedios (Zaremborg y Moreno, 1996) entre una cepa salvaje y una muy activa. Analizamos el comportamiento de esta cepa en respuesta al agregado de glucosa, determinando los niveles de cAMP, la actividad *in situ* de la PKA (- y + cAMP agregado exógenamente) y el estado de fosforilación de Tpk1p (Figura 5 C, D, E). Como era de esperar para una cepa con actividad quinasa intermedia y como consecuencia, retro-

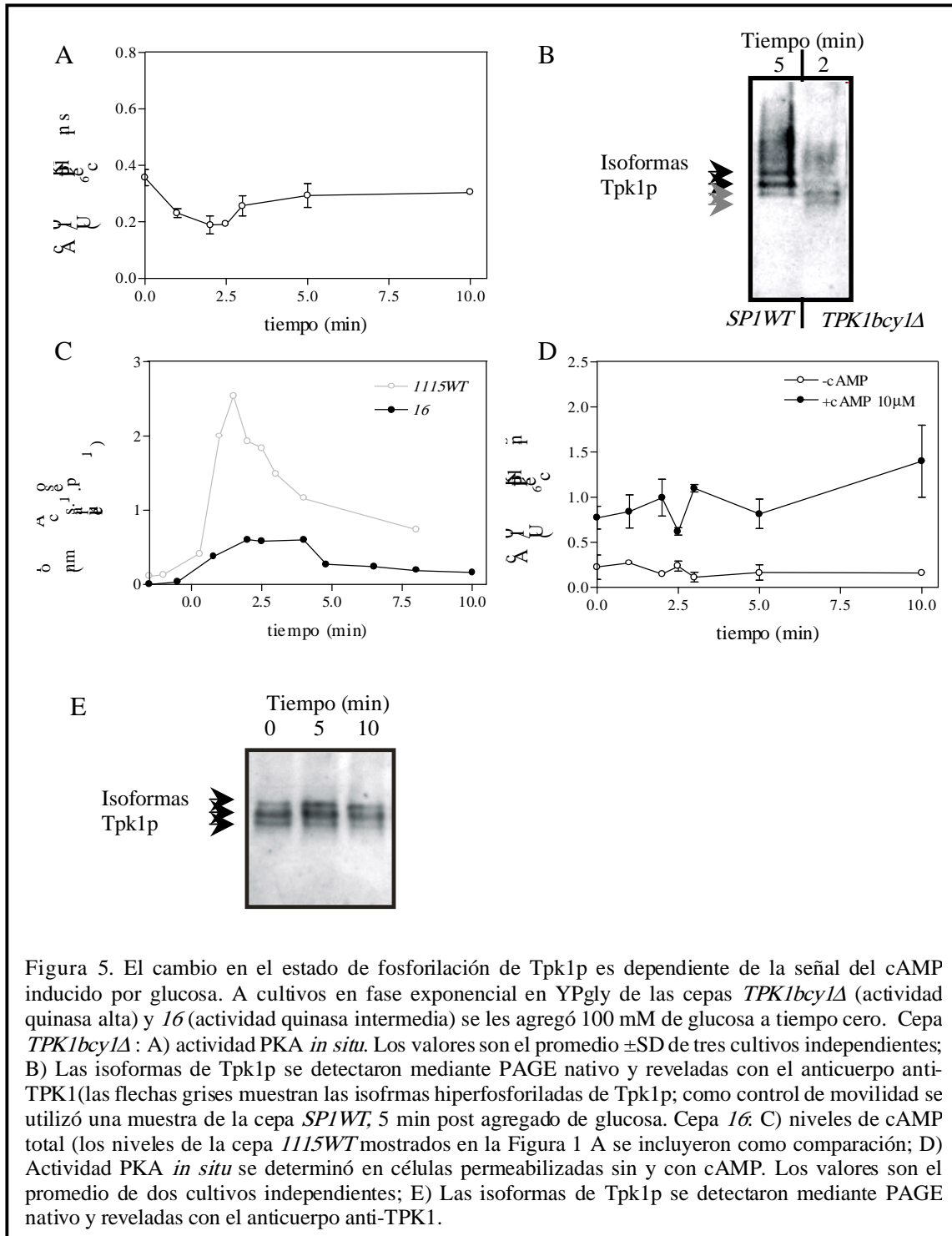


Figura 5. El cambio en el estado de fosforilación de Tpk1p es dependiente de la señal del cAMP inducido por glucosa. A) Cultivos en fase exponencial en YPgly de las cepas *TPK1bcy1Δ* (actividad quinasa alta) y *16* (actividad quinasa intermedia) se les agregó 100 mM de glucosa a tiempo cero. Cepa *TPK1bcy1Δ*: A) actividad PKA *in situ*. Los valores son el promedio  $\pm$ SD de tres cultivos independientes; B) Las isoformas de Tpk1p se detectaron mediante PAGE nativo y reveladas con el anticuerpo anti-TPK1 (las flechas grises muestran las isoformas hiperfosforiladas de Tpk1p; como control de movilidad se utilizó una muestra de la cepa *SPIWT*, 5 min post agregado de glucosa. Cepa *16*: C) niveles de cAMP total (los niveles de la cepa *1115WT* mostrados en la Figura 1 A se incluyeron como comparación; D) Actividad PKA *in situ* se determinó en células permeabilizadas sin y con cAMP. Los valores son el promedio de dos cultivos independientes; E) Las isoformas de Tpk1p se detectaron mediante PAGE nativo y reveladas con el anticuerpo anti-TPK1.

inhibición negativa moderada sobre la Pde2, la cepa 16 acumuló cierto nivel de cAMP sin incremento por el agregado de glucosa (Figura 5C). Este resultado indica un fuerte efecto inhibitorio ejercido por la mayor actividad PKA presente en la cepa 16.

La actividad *in situ* de PKA en ausencia o presencia de cAMP agregado exógenamente resultó prácticamente constante durante la estimulación por glucosa, como era de esperar para una respuesta vía a cAMP muy baja (Figura 5 D). El análisis por medio de western blot nativo reveló la presencia de tres isoformas sin cambio en la abundancia relativa durante el estímulo (Figura 5 E).

Este conjunto de resultados muestra una correlación directa entre el nivel *in vivo* basal de actividad PKA (detectado por un ensayo *in situ* + cAMP exógeno o por predicción genética) de las cepas analizadas:  $tpk1^{wl} < TPK1BCY1 < 16 < TPK1bcy1\Delta$  y el estado de fosforilación de Tpk1p. Una mayor actividad PKA correlaciona con un estado de fosforilación mayor de Tpk1p, indicando además que esta proteína puede ser fosforilada en múltiples sitios.

En conclusión, el cambio en el patrón de fosforilación de Tpk1p luego del agregado de glucosa a células crecidas en glicerol, fue completamente dependiente de la activación de la vía cAMP-PKA. La ausencia de actividad PKA o de señalización por cAMP anula el cambio en el estado de fosforilación de Tpk1p en respuesta a glucosa.

Análisis del estado de fosforilación de Tpk1p durante el metabolismo respiratorio y fermentativo.

Hasta aquí hemos descrito que el estado de fosforilación de Tpk1p cambia gradualmente hacia isoformas fosforiladas durante la transición del metabolismo respiratorio al fermentativo. Basándonos en esto, decidimos investigar el patrón de fosforilación de Tpk1p durante el crecimiento en diferentes fuentes de carbono. En células creciendo sobre acetato y glicerol, la isoforma principal detectada fue la isoforma de menor movilidad (Figura 6 A, calles Ac y Gli); en el mismo sentido, en presencia de una fuente de carbono poco fermentable, como la galactosa, las isoformas detectadas presentan una abundancia relativa similar a las presentes en células crecidas en fuente de carbono no fermentable (Figura 6 A,



calle Gal). A diferencia, las células crecidas sobre glucosa muestran una proporción similar de ambas isoformas (Fig 6 A, calle Glu).

Tomando en consideración la relación directa entre estado de fosforilación de Tpk1p y la fuente de carbono, decidimos estudiar el comportamiento del estado de fosforilación durante el crecimiento diauxico.

El crecimiento diauxico es la transición del metabolismo óxido-reductor (fermentación) a uno puramente oxidativo (respiración). Cuando las levaduras son crecidas en un medio rico en azúcares fermentables crecen rápido abastecidas energéticamente vía fermentación con la producción de etanol. Cuando el azúcar es consumido, las levaduras utilizan el etanol como fuente de carbono para el crecimiento aerobiótico.

El análisis de las isoformas de Tpk1p durante el crecimiento exponencial reveló la presencia de dos isoformas (similar a las observadas en Figura 6 A, calle Glu).

A medida que la concentración de glucosa disminuye (Figura 6 C, muestra 5, correspondiente a 80 mM de glucosa en el medio) pero antes del consumo completo se observó mayor abundancia de las especies con menor movilidad correspondientes a un estado de fosforilación menor.

Este resultado indicaría que la acumulación de isoformas con mayor estado de fosforilación de Tpk1p depende de niveles altos de glucosa. Además, también se observó una acumulación de isoformas con menor movilidad cuando se consumió completamente la glucosa, condición en la cual las células se encuentran respirando etanol.

Analizamos el estado de fosforilación de Tpk1p en la cepa *gpr1Δ*, que carecen del receptor Gpr1 al cual se une la glucosa con baja afinidad ( $EC_{50}$ : 20-75 mM), Éstas cepas mutantes mostraron una menor proporción de especies fosforiladas durante el crecimiento exponencial en glucosa (resultado no mostrado). Estos resultados, indicarían que el cambio en el estado de fosforilación de la subunidad catalítica Tpk1p, observado durante el crecimiento diauxico depende de la señalización a través del sistema GPCR.

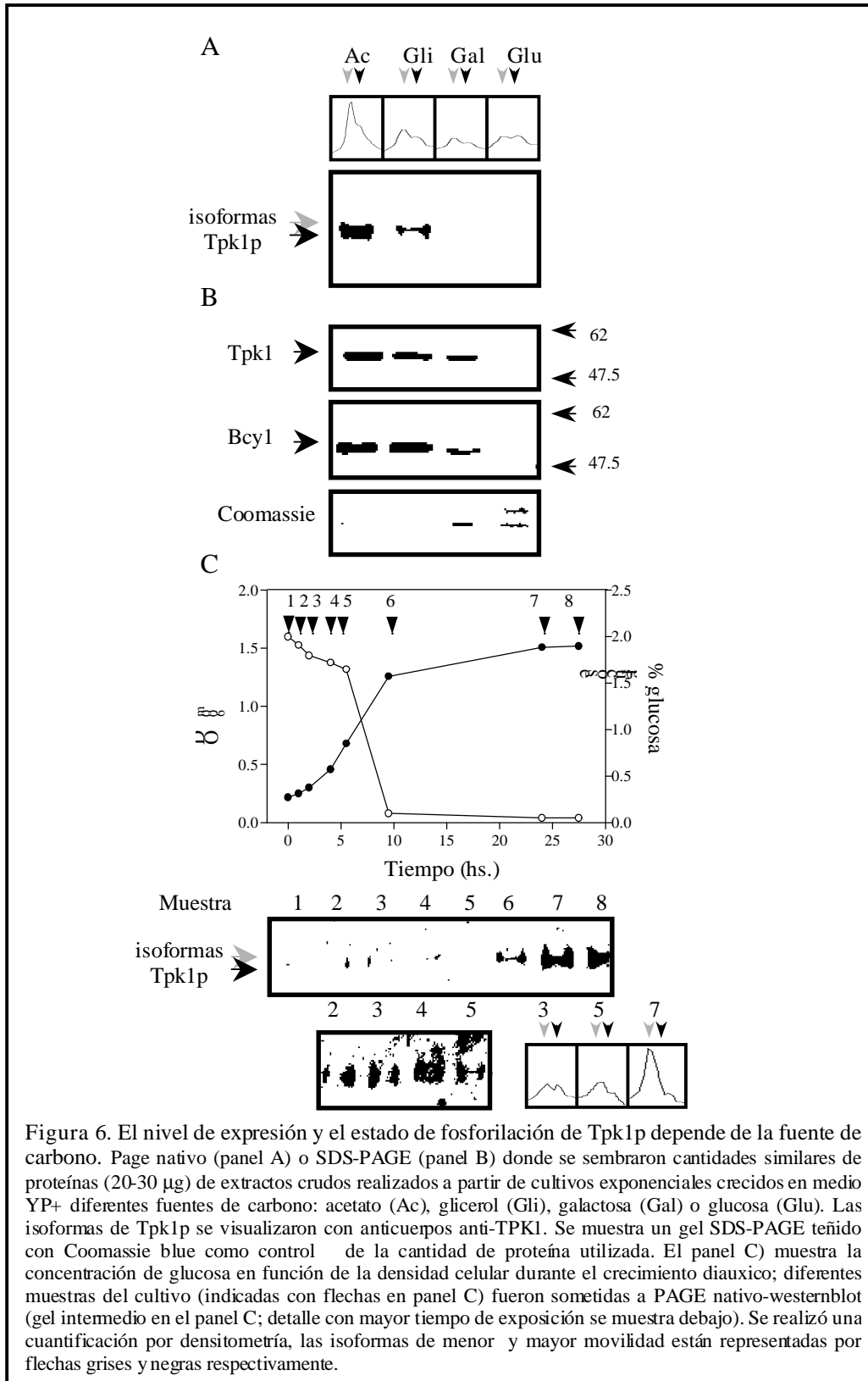


Figura 6. El nivel de expresión y el estado de fosforilación de Tpk1p depende de la fuente de carbono. Page nativo (panel A) o SDS-PAGE (panel B) donde se sembraron cantidades similares de proteínas (20-30 µg) de extractos crudos realizados a partir de cultivos exponenciales crecidos en medio YP+ diferentes fuentes de carbono: acetato (Ac), glicerol (Gli), galactosa (Gal) o glucosa (Glu). Las isoformas de Tpk1p se visualizaron con anticuerpos anti-TPK1. Se muestra un gel SDS-PAGE teñido con Coomassie blue como control de la cantidad de proteína utilizada. El panel C) muestra la concentración de glucosa en función de la densidad celular durante el crecimiento diauxico; diferentes muestras del cultivo (indicadas con flechas en panel C) fueron sometidas a PAGE nativo-western blot (gel intermedio en el panel C; detalle con mayor tiempo de exposición se muestra debajo). Se realizó una cuantificación por densitometría, las isoformas de menor y mayor movilidad están representadas por flechas grises y negras respectivamente.

Además, observamos que el estado de fosforilación de Tpk1p depende de la fuente de carbono, ya que la presencia de una fuente de carbono fermentable, produce la acumulación de isoformas fosforiladas.

Al mismo tiempo, encontramos un aumento en los niveles de Tpk1p durante el crecimiento en fuente de carbono no fermentable (Figura 6 B). En células crecidas en acetato o glicerol, se observó un incremento en la expresión de Bcy1p con disminución en la movilidad electroforética (Fig 6 B).

Se ha descrito previamente que en células crecidas en fuente de carbono no fermentable o en fase estacionaria de crecimiento, Bcy1p aumenta su expresión, su estado de fosforilación y cambia su localización intracelular (Werner-Washburne *et al*, 1993; Griffioen *et al*, 2003). La interpretación de estos resultados sugiere que el incremento en la inhibición de PKA vía el aumento de los niveles de subunidad regulatoria es necesario para el establecimiento de la fase de crecimiento estacionaria.

Sin embargo, nosotros observamos un cambio concomitante en los niveles de Tpk1p, tanto cuando las células crecen en fuente de carbono no fermentable o luego del crecimiento diauxico (Figura 6 C).

Los resultados obtenidos de un estudio de expresión génica durante el crecimiento diauxico (DeRisi *et al*, 1997) permiten confirmar que la expresión de los genes TPK1/2/3 y BCY1 aumenta concertadamente cuando los niveles de glucosa comienzan a disminuir.

A través del análisis de los fenotipos dependientes de PKA, se establece que la actividad de PKA se encuentra disminuída durante el crecimiento en fuente de carbono no fermentable o durante el crecimiento estacionario (Thevelein y de Winde, 1999). Previamente, nosotros hemos descrito que la actividad endógena de la PKA determinada en la cepa *1115WT* es tres veces menor en células creciendo en fase estacionaria comparada con la fase exponencial (Capítulo 1). Queda por explicar como la actividad PKA es regulada negativamente cuando, paradójicamente, ambas subunidades aumentan su nivel de expresión durante condiciones metabólicas desreprimidas.

Efecto de la fosforilación sobre la actividad catalítica de Tpk1p.

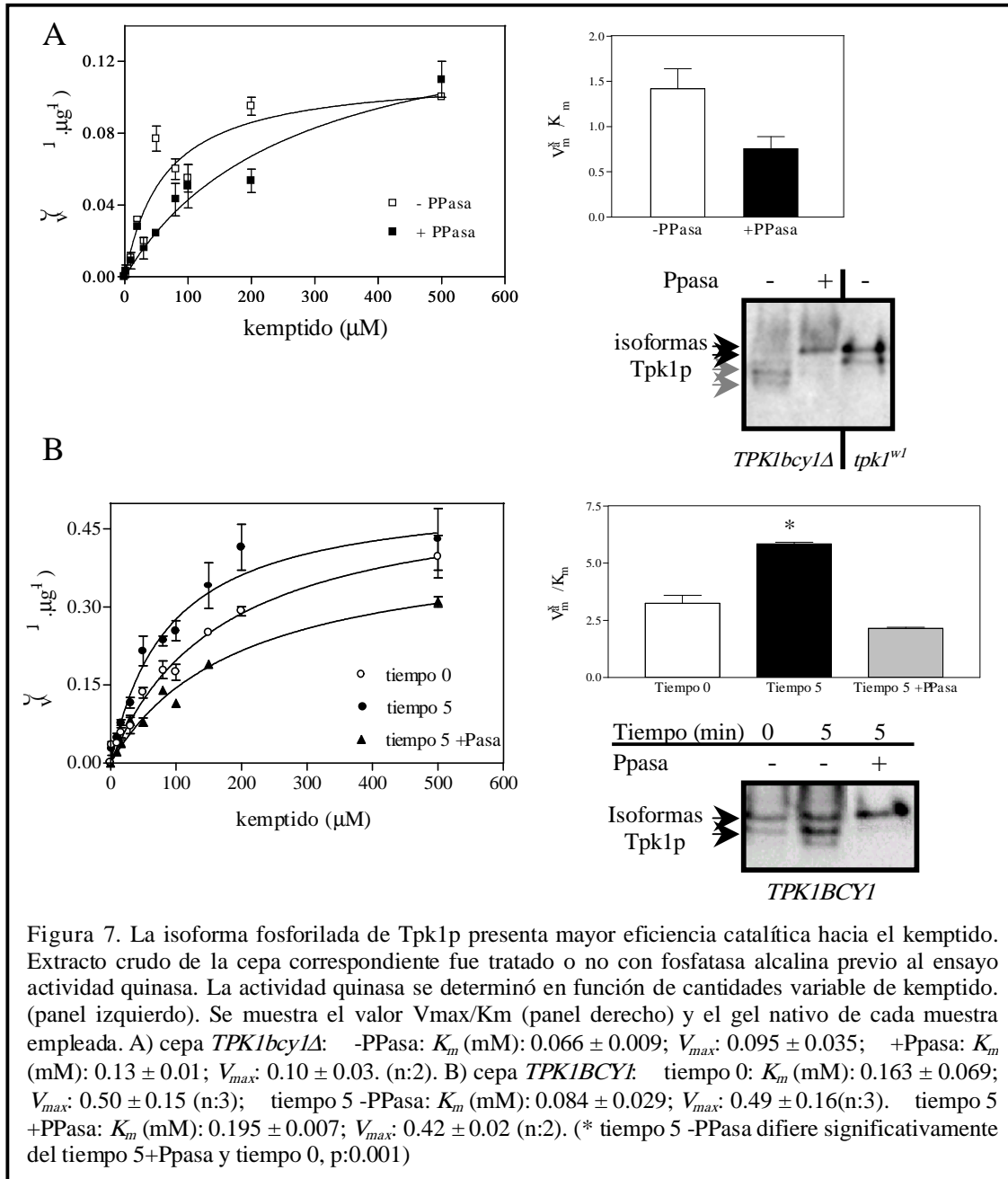
Con el objetivo de analizar si los cambios en el estado de fosforilación de Tpk1p inducidos por glucosa tienen alguna consecuencia sobre la actividad catalítica, analizamos el efecto del tratamiento con fosfatasa alcalina sobre la actividad Tpk1p conteniendo diferentes grados de fosforilación.

En primera instancia, se utilizó un extracto crudo de la cepa *TPK1bcy1Δ*, la cual posee mayor abundancia relativa de isoformas hiperfosforilada de Tpk1p. La fosfatasa alcalina empleada en el ensayo puede ser eliminada de la reacción por magneto-precipitación, para evitar la interferencia en el ensayo de fosforilación posterior. La actividad catalítica se determinó en preparaciones hiperfosforiladas o defosforiladas utilizando diferentes concentraciones de kemptido (Figura 7 A). Los datos mostrados en la Figura 7 A fueron analizados utilizando la ecuación de Michaelis-Menten, y los parámetros cinéticos obtenidos se utilizaron para estimar la constante de especificidad. El valor  $V_{max}/K_m$  es un parámetro que permite determinar la especificidad de una enzima por un sustrato. La Figura 7 A panel derecho, muestra las constantes de especificidad estimadas en la cepa *TPK1bcy1Δ* tratadas o no con fosfatasa alcalina; este resultado indica que la defosforilación disminuye la constante de especificidad, es decir que las isoformas de Tpk1p fosforiladas poseen mayor reactividad hacia el sustrato. Este cambio, se debe principalmente a un aumento en la afinidad.

Con el objetivo de analizar si la fosforilación de Tpk1p provocada por el agregado de glucosa aumenta la reactividad hacia un sustrato, medimos la actividad quinasa en función de diferentes concentraciones de kemptido utilizando extractos crudos de la cepa *TPK1BCY1*, los cuales fueron preparados a partir de muestras cosechadas a tiempo 0 (pre-agregado de glucosa) y tiempo 5 min post agregado de glucosa (Figura 7 B, panel izquierdo).

El panel derecho muestra la variación de la constante de especificidad. Puede observarse que el aumento de la abundancia relativa de isoformas más fosforiladas de Tpk1p por el agregado de glucosa provocó un aumento en la constante de especificidad, principalmente debido a una aumento de la afinidad. El tratamiento con fosfatasa alcalina de la muestra cosechada 5 min post agregado de glucosa (tiempo 5 +Ppasa), provocó una disminución de

la constante de especificidad, corroborando el efecto positivo de la fosforilación de Tpk1p sobre la reactividad hacia el sustrato.



Es de notar que, a pesar de utilizar muestras heterogéneas con respecto a la fosforilación de Tpk1p, el efecto de la fosforilación sobre la actividad catalítica es aún observado.

### 2.3) Discusión.

Activación *in situ* de la PKA en células estimuladas por glucosa.

En este capítulo hemos descrito la activación dinámica de la PKA *in vivo* durante la transición del metabolismo respiratorio al fermentativo. Concentraciones altas de glucosa (100mM) disparan la activación de la adenilato ciclasa vía el sistema GPCR, produciéndose un aumento en los niveles de cAMP intracelulares. Para determinar la actividad PKA se utilizaron células permeabilizadas sin y con el agregado de cAMP exógeno en la reacción enzimática.

En el Capítulo 1 ya demostramos que este método resultó adecuado para determinar la actividad endógena en distintas cepas (*pep4Δ*), que poseen diferentes niveles de actividad quinasa constitutivamente activa como consecuencia de sobreexpresar la subunidad regulatoria salvaje o mutante. En ese caso, el estado de disociación de la holoenzima y los niveles de cAMP endógenos eran estables.

A juzgar por los resultados obtenidos en este capítulo, el empleo de células permeabilizadas para la determinación de la actividad PKA *in vivo* durante un estímulo fisiológico, parece tener otro alcance.

Al utilizar la cepa *1115WT* (la cual posee una delección en el gen *PEP4*), se observó un pequeño pico de actividad endógena en correlación con el pico de cAMP endógeno. Sin embargo, para el resto de las cepas utilizadas, los niveles endógenos se encontraron por debajo del límite de detección del método. Cuando se realizó el ensayo *in situ* en presencia de 10μM de cAMP agregado exógenamente, observamos un pico de actividad siguiendo la dinámica del cAMP intracelular.

En resultados previos, hemos obtenido que la actividad *in vitro* determinada en extractos crudos en presencia de 10μM de cAMP siempre es mayor que la determinada *in situ* mas 10μM de cAMP. Cuando comparamos los valores numéricos de la actividad PKA en las cepas *TPK1BCY1* y *TPK1bcy1Δ* (Tabla I), obtuvimos una explicación para esta diferencia. Mientras que en la cepa *TPK1BCY1* la actividad PKA *in vitro* resultó aproximadamente 180 veces mayor que la calculada a partir de los datos *in situ* en presencia de 10 μM de

cAMP, en la cepa *TPK1bcy1Δ* la actividad total fue similar en extractos crudos y en células permeabilizadas (ver Relación de actividades, Tabla I).

| Cepa    | Nomenclatura     | Actividad PKA <i>in situ</i> <sup>a</sup><br>(U/10 <sup>6</sup> células) |        | Actividad PKA total <sup>b</sup><br>(U/μg proteínas) | Valor estimado de la actividad total <sup>c</sup><br>(U/μg proteínas) |        | Relación de actividades <sup>d</sup> |        |
|---------|------------------|--|--------|--|---|--------|--------------------------------------|--------|
|         |                  | T0   | T max. |  | T0  | T max. | T 0                                  | T max. |
| SP1     | <i>SPIWT</i>     | 0.12   | 0.33   | 0.80   | 0.0080  | 0.020  | 100                                  | 40     |
| S7-7 A  | <i>TPK1BCY1</i>  | 0.04   | 0.08   | 0.45   | 0.0025  | 0.005  | 180                                  | 90     |
| S13-3 A | <i>TPK1bcy1Δ</i> | 0.3  | 0.3    | 0.09   | 0.02  | 0.02   | 4                                    | 4      |

Tabla I. Comparación de los niveles de actividad quinasa determinada *in situ* e *in vivo*.

<sup>a</sup> Actividad PKA *in situ* determinada en células permeabilizadas y <sup>b</sup> actividad PKA total determinada en extractos crudos (estos valores no cambian durante los 10 min. después del agregado de glucosa) se ensayaron en presencia de 10 μM de cAMP como se describe en *M&M14*. Para la actividad de PKA *in situ* se determinaron los valores a *tiempo 0* (antes del agregado de glucosa) y *tiempo max* (tiempo de máxima respuesta luego del agregado de glucosa). <sup>c</sup> La estimación de la actividad total de PKA a partir de los datos de actividad *in situ* se calcularon asumiendo que 1 célula contiene 1.6x10<sup>-5</sup> μg de proteína. <sup>d</sup> La relación de actividades se calculó mediante el cociente entre la actividad PKA total<sup>b</sup> y el valor estimado de la actividad total<sup>c</sup>.

La diferencia entre estas dos cepas reside en la presencia o ausencia de Bcy1p. El hecho que se pueda medir menos actividad en células permeabilizadas que en extractos crudos, cuando se agrega 10 μM de cAMP exógenamente, puede interpretarse como consecuencia de la dificultad de sobrepasar la inhibición que ejerce la subunidad regulatoria sobre la subunidad catalítica, cuando la holoenzima esta concentrada en los compartimentos subcelulares, como ocurre en las células permeabilizadas.

Bajo este razonamiento, interpretamos e hipotetizamos que el pico transiente de actividad *in situ* más cAMP es el resultado de la activación extra ejercido por el agregado de cAMP exógeno sobre las moléculas de holoenzima que han sido “primadas” previamente por el cAMP endógeno evocado por el agregado de glucosa. Pero, sin embargo, en el punto de máxima activación de la curva, estamos determinando 40-90 veces menos de actividad *in situ* que en extractos crudos (Tabla I).

Una posibilidad que podemos plantear, es que esas moléculas de holoenzima “primadas” son aquellas que han tenido acceso al cAMP intracelular evocado por la glucosa y que



luego el proceso de permeabilización adquirieron un estado "pre-cargado" sin actividad catalítica pero fácilmente activables por el agregado de cAMP exógeno.

Pensamos que el estado pre-cargado sin actividad catalítica es consecuencia de la pérdida del cAMP libre intracelular luego de la permeabilización (observaciones no publicadas) y del cAMP unido al sitio B de Bcy1. El agregado de cAMP 10  $\mu$ M exógeno compensaría esta pérdida y permitiría la detección de más actividad catalítica.

No pensamos que la fosforilación de Tpk1p, descrita luego, es parte de este mecanismo, ya que el incremento de la abundancia de isoformas más fosforiladas es posterior a la activación de la PKA. Por lo tanto, y a pesar de las limitaciones del empleo de células permeabilizadas, pensamos que el pico de actividad observado en los ensayos *in situ* + cAMP puede ser empleado para seguir la activación transiente de la PKA *in vivo*. En congruencia con los resultados del Capítulo 1, el empleo de extractos crudos no permitió medir la activación *in vivo* de la PKA evocado por glucosa.

En la práctica, para seguir la activación *in vivo* de la PKA, se analiza la fosforilación de sustratos. Si bien esto implica analizar la activación a través de una respuesta fisiológica, muchas veces no permite observar el descenso de la actividad PKA; además puede no correlacionar con la activación de la PKA debido principalmente a la entrada de múltiples vías de regulación que pueden afectar el estado de fosforilación del sustrato elegido.

El cambio dinámico en el estado de fosforilación de Tpk1p es dependiente de la fuente de carbono.

En este capítulo presentamos evidencia que demuestra, por primera vez, una modificación en el estado de fosforilación de la subunidad catalítica de la PKA en respuesta a una señal fisiológica. El estado de fosforilación de Tpk1p cambia a isoformas más fosforiladas durante la transición del metabolismo respiratorio al fermentativo. Este cambio ocurre luego de que se produce el pico de cAMP evocado por glucosa y depende de la activación de la PKA disparada por el cAMP. El grado basal de fosforilación de Tpk1p, observado a tiempo 0 antes del agregado de glucosa a células creciendo en glicerol, es proporcional al estado de activación que presenta la quinasa en estas células ( $Tpk1^{w1} < SP1WT = W303WT$

= *TPK1BCY1 1115WT* < 16 < *TPK1bcy1Δ*). La diferencia en el estado de fosforilación de Tpk1p en la cepa *1115WT* puede observarse en la Figura 3, no solo presenta mayor abundancia de la isoforma más fosforilada, sino la presencia en menor abundancia de una tercer isoforma. Esta observación estaría asociada con el hecho que esta cepa fue la única con actividad PKA endógena detectable durante el pico de cAMP intracelular.

Si bien demostramos la regulación post-traducciona solo en la isoforma Tpk1p, podemos especular que este fenómeno ocurriría sobre las tres isoformas catalíticas de *S. cerevisiae* por varias razones: (1) la actividad total y el nivel de PKA (determinada *in situ*, *in vitro* y por inmunoblot) en la cepa *TPK1BCY1* es 2-3 veces menor que en la cepa parental *SPIWT*, indicando que Tpk2p y Tpk3p (en menor medida) contribuyen a la actividad detectada en la cepa salvaje, esto concuerda con resultados previos (Mazón, *et al* 1993); (2) la regulación de la actividad PKA, determinada *in situ*, es la misma tanto en la cepa *SPIWT* como en *TPK1BCY1*; (3) el grado de cambio en el estado de fosforilación de Tpk1p es análogo en ambas cepas.

El análisis electroforético bi-dimensional de Tpk1p indica que esta proteína esta sujeta a varias modificaciones pos-traduccionales, algunas de ellas producto de la fosforilación en múltiples residuos serinas (Levin y Zoller, 1990). A excepción de la Thr-241, los aminoácidos fosforilados restantes no han sido aún identificados. Se ha demostrado que la fosforilación de la Thr-241 es estable ya que fue identificada como fosfo-Thr241 en la subunidad Tpk1 cristalizada (Mashhoon, *et al*, 2001). Este aminoácido es análogo a la Thr-197 presente en el loop catalítico de C de mamíferos; la mutación por alanina de este residuo afecta la actividad catalítica y particularmente la interacción con la subunidad regulatoria, ya que la mutación disminuye la afinidad 30 veces en la mutante (Moore *et al*, 2002; Levin y Zoller, 1990).

En la C de mamíferos, la Thr-197 fosforilada, esencial para la actividad catalítica de la enzima, es resistente a la desfosforilación *in vitro* (Toner-Weeb *et al*, 1992). Es posible por lo tanto que la isoforma menos fosforilada de Tpk1p, la cual presenta menor movilidad en los geles nativos, contenga fosfo-Thr-241 resistente a la desfosforilación por fosfatasa alcalina. Los cambios mostrados en Tpk1p en respuesta a glucosa podrían ocurrir probablemente en otros aminoácidos no caracterizados aún.

La Figura 7 muestra los resultados de experimentos cinéticos realizados con muestras de Tpk1p, las cuales presentaban diferente abundancia relativa de las isoformas fosforiladas (tiempo 0 y 5 min post estímulo con glucosa). Observamos que un aumento en la proporción de isoformas fosforiladas provocó un incremento en la constante de especificidad ( $V_{max}/K_m$ ) hacia el kemptido. Estos resultados preliminares sugieren que la fosforilación de Tpk1p produce un efecto positivo sobre la eficiencia de catálisis.

El estado de fosforilación de Tpk1 es dependiente de la fuente de carbono, células creciendo en fuente de carbono no fermentable presentan mayor abundancia de isoformas menos fosforiladas. A diferencia, células creciendo en fuente de carbono fermentable muestran proporciones iguales o mayores de la isoforma mas fosforilada (Figura 5).

El estado de fosforilación de Tpk1p es dinámico, por un lado durante la transición del metabolismo respiratorio al fermentativo (Figura 1), hay un cambio en la abundancia relativa de las isoformas detectadas, incrementándose hacia mayor estado de fosforilación luego del agregado de glucosa. Por otro lado, durante el crecimiento diauxico (Figura 6) el cambio es opuesto, la disminución de la glucosa extracelular es acompañada por un incremento en la proporción de isoformas menos fosforiladas.

Experimentos de crecimiento diauxico o de estimulación con glucosa a células creciendo en glicerol, utilizando una cepa salvaje o *gpr1Δ*, indicaron que es necesaria la señalización a través del sistema GPCR inducida por glucosa para producir cambios en el estado de fosforilación de Tpk1p.

Se ha postulado que el sistema GPCR es importante en la estimulación de la síntesis de cAMP durante la transición del metabolismo respiratorio al fermentativo y posee un rol secundario en el control de la vía del cAMP en células creciendo en glucosa (Kraakman *et al*, 1999; Colombo *et al*, 1998). Sin embargo, una posible explicación del efecto que tiene la delección de *GPR1* sobre diferentes fenotipos controlados por PKA, podría residir en la influencia positiva de GPCR, a través de la detección de glucosa extracelular, sobre la fosforilación y como consecuencia sobre la actividad de subunidad catalítica.

La relevancia fisiológica del estado de fosforilación reversible de la PKA, ajustable a la presencia /ausencia de glucosa, podría ofrecer un control refinado de la actividad quinasa, actuando positivamente a través de la fosforilación de Tpk1p cuando es necesario mantener

el metabolismo fermentativo, o negativamente, a través de la desfosforilación, cuando es necesario apagar la actividad quinasa (fase estacionaria o metabolismo respiratorio).

Por lo tanto, existiría un mecanismo nuevo de control de la actividad PKA a través de la fosforilación reversible; pudiendo este mecanismo actuar en suma o concertadamente con los mecanismos regulatorios conocidos: niveles intracelulares de cAMP, inhibición por la subunidad regulatoria, y la compartimentalización subcelular.



## Capítulo 3

Identificación de nuevos sustratos de la Proteína Quinasa A de levaduras,  
Pyk1 y Pyk2: Caracterización cinética de la fosforilación.

### 3.1) Introducción

La fosforilación de proteínas es un mecanismo regulatorio universal; específicamente en células eucariotas, implicado en muchos aspectos de la fisiología y bioquímica celular. En *Saccharomyces cerevisiae* la proteína quinasa A (PKA) se encuentra en el corazón de una importante ruta de transducción de señales, controlando diferentes blancos tanto a nivel transcripcional como post-traducciona, en respuesta a cambios en las condiciones del medio ambiente (Thevelein *et al*, 1999). La glucosa es la fuente de carbono preferida de *S. cerevisiae*, y como tal posee un rol regulatorio en la fisiología celular. Las células de levaduras, al igual que otros organismos o células, son capaces de llevar a cabo glucólisis y gluconeogénesis, u han desarrollado diversos mecanismos regulatorios para evitar el funcionamiento simultáneo de estas vías metabólicas antagónicas (Entian *et al*, 1992 y Navas *et al*, 1996). La PKA esta presente en este proceso a través de la regulación transcripcional o post-traducciona de algunas enzimas metabólicas. Las levaduras en presencia de azúcares fermentables, mantienen la vía glucolítica activa; el comienzo del flujo glucolítico parece depender del estímulo coordinado de múltiples eventos, incluyendo la regulación alostérica de las actividades enzimáticas, modificación post-traducciona de proteínas y la modulación de la expresión génica.

Algunos blancos (directos o indirectos) de la PKA son 1) enzimas involucradas en la síntesis y la degradación de trehalosa, incluyendo la trehalasa y la trehalosa-6-fosfato sintasa; 2) enzimas involucradas en la síntesis y degradación de glucógeno, como la glucógeno sintasa y la glucógeno fosforilasa; y 3) enzimas involucradas en el flujo glucolítico, como la fosfofructoquinasa y la fructosa-bifosfatasa (Thevelein *et al*, 1999 y Dickinson *et al.*, 1999). En muchos casos, no se conoce si la estimulación o inhibición de sus actividades es consecuencia directa de la fosforilación por PKA.

Durante el desarrollo de este trabajo, se ha reportado que la piruvato quinasa (Pyk) es fosforilada por PKA *in vitro* (Cytryńska *et al*, 2001 y Rayner *et al*, 2002).

Un ejemplo del rol de la PKA a nivel transcripcional son los genes *PFK26* y *PFK27*, que codifican para la 6-fosfofructo-2-quinasa; cuya expresión depende de la fuente de carbono, vía cAMP (Rayner *et al*, 2002).

Además del mecanismo de activación de la PKA ejercido por el cAMP, el cual involucra la disminución de la afinidad entre subunidades R y C, en la actualidad varios autores han centrado sus estudios en el rol del sustrato en el mecanismo de activación de la holoenzima. En condiciones de equilibrio y a altas concentraciones de enzima, similares a las encontradas en la célula, se ha demostrado que los sustratos podrían participar en la activación de la holoenzima (Zaremborg *et al*, 2000; Vigil *et al*, 2004).

En la mayoría de los casos, se han empleado sustratos sintéticos, los cuales han permitido la caracterización de determinantes específicos que contribuyen al reconocimiento y especificidad por parte de la proteína quinasa. El hallazgo y caracterización de nuevos sustratos, utilizando proteínas nativas, permitiría avanzar en el conocimiento de los determinantes aminoacídicos dentro del contexto proteico, ya que pueden presentar propiedades cinéticas diferentes que los péptidos sintéticos derivados de ellas.

Durante la búsqueda de nuevos sustratos en *S. cerevisiae*, encontramos que ambas isoformas de la piruvato quinasa, Pyk1 y Pyk2, son sustratos de la proteína quinasa A. La enzima Pyk1 es la última enzima en la ruta glucolítica del catabolismo de azúcares; que cataliza la conversión irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) a piruvato por el agregado de un protón y la pérdida de un grupo fosfato, que es transferido al ADP. La enzima es alostéricamente activada por fructosa 1,6-bisfosfato (FBP), y su expresión génica es dependiente de la presencia de glucosa en el medio de cultivo (Jurica *et al*, 1998).

Con la finalización del proyecto de secuenciación del genoma de *S. cerevisiae*, se ha reportado un marco de lectura abierto que codifica para una proteína con alta homología a Pyk1. La caracterización de este gen indicó la existencia de la proteína Pyk2, la cual es insensible a FBP y cuya expresión génica es reprimida por glucosa (Boles *et al*, 1997).

En este capítulo se identificaron a la Pyk1 y Pyk2 como sustratos de la PKA tanto *in vitro* como *in vivo*, caracterizando su comportamiento como sustratos (Sección I).



Identificamos el sitio de fosforilación en Pyk1 y evaluamos las diferencias cinéticas entre la proteína entera y un péptido derivado de ésta. Por último se analizó el efecto de la fosforilación sobre la actividad de la piruvato quinasa (Sección II).

Cepas utilizadas en este capítulo.

| Nomenclatura                        | Fenotipo principal  |
|-------------------------------------|---|
| EJ758 + GST-Pyk2                    | Cepa expresando la proteína de fusión GST-Pyk2  |
| EJ758 + GST-Pyk1                    | Cepa expresando la proteína de fusión GST-Pyk1  |
| 1115                                | Cepa salvaje, <i>pep4Δ</i>  |
| 1115+HA-TPK1                        | Cepa expresando la proteína de fusión HA-Tpk1   |
| 1115+HA-TPK1+Yep51-BCY1             | Cepa expresando la proteína de fusión HA-Tpk1 y sobreexpresando la subunidad regulatoria salvaje de PKA |
| 1115+GST                            | Cepa expresando la proteína GST   |
| 1451                                | Cepa mutante <i>bcy1-14</i> , actividad PKA alta  |
| <i>tpk1<sup>w1</sup></i>            | Cepa con un alelo mutado de la subunidad catalítica, sin actividad quinasa                              |
| <i>tpk1<sup>w1</sup></i> + GST-Pyk2 | Cepa sin actividad quinasa expresando la proteína GST-Pyk2  |
| <i>tpk1<sup>w1</sup></i> + GST-Pyk1 | Cepa sin actividad quinasa expresando la proteína GST-Pyk1  |
| Pyk1-5+pPYK101-Pyk1                 | Cepa que sobreexpresa Pyk1 salvaje, carece de la expresión cromosómica de Pyk1                          |
| Pyk1-5+pPYK101-Pyk1S22A             | Cepa que sobreexpresa Pyk1 con la Ser22 mutada por Ala, carece de la expresión cromosómica de Pyk1      |
| Pyk1-5+pPYK101-Pyk1T94A             | Cepa que sobreexpresa Pyk1 con la Thr98 mutada por Ala, carece de la expresión cromosómica de Pyk1      |

### 3.2) Resultados

Sección I: Fosforilación *in vitro* e *in vivo* de las dos isoformas de la piruvato quinasa de levaduras por la Proteína Quinasa A

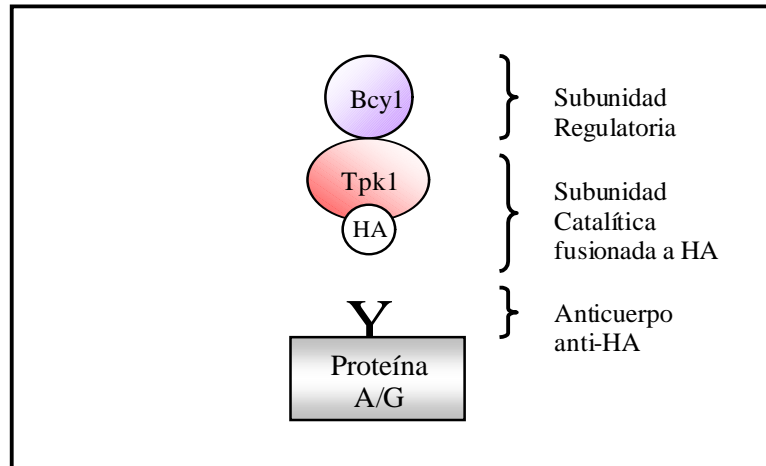
Identificación de sustratos de la PKA en levaduras.

Para identificar nuevas proteínas sustrato de la PKA de *S. cerevisiae* el abordaje utilizado consistió en inmunoprecipitar la holoenzima PKA y luego analizar las proteínas co-inmunoprecipitadas. La metodología experimental comprendió la expresión de la proteína Tpk1 fusionada a un epítipo de hemoaglutinina (HA) junto con la sobreexpresión de subunidad regulatoria Bcy1.

Se realizó una inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-HA, de extracto crudo de una cepa co-transformada con los vectores Ycp50-*HATPK1* y Yep51-*BCY1* (*M&M2I*).

Se determinó en muestras del inmunoprecipitado actividad de PKA en presencia y ausencia de cAMP utilizando kemptido como sustrato. Los complejos inmunoprecipitados con anticuerpos anti-HA presentaron actividad +/- cAMP: 0.2, indicando una buena preparación enzimática; no se detectó actividad PKA en los inmunoprecipitados inespecíficos con suero preinmune.

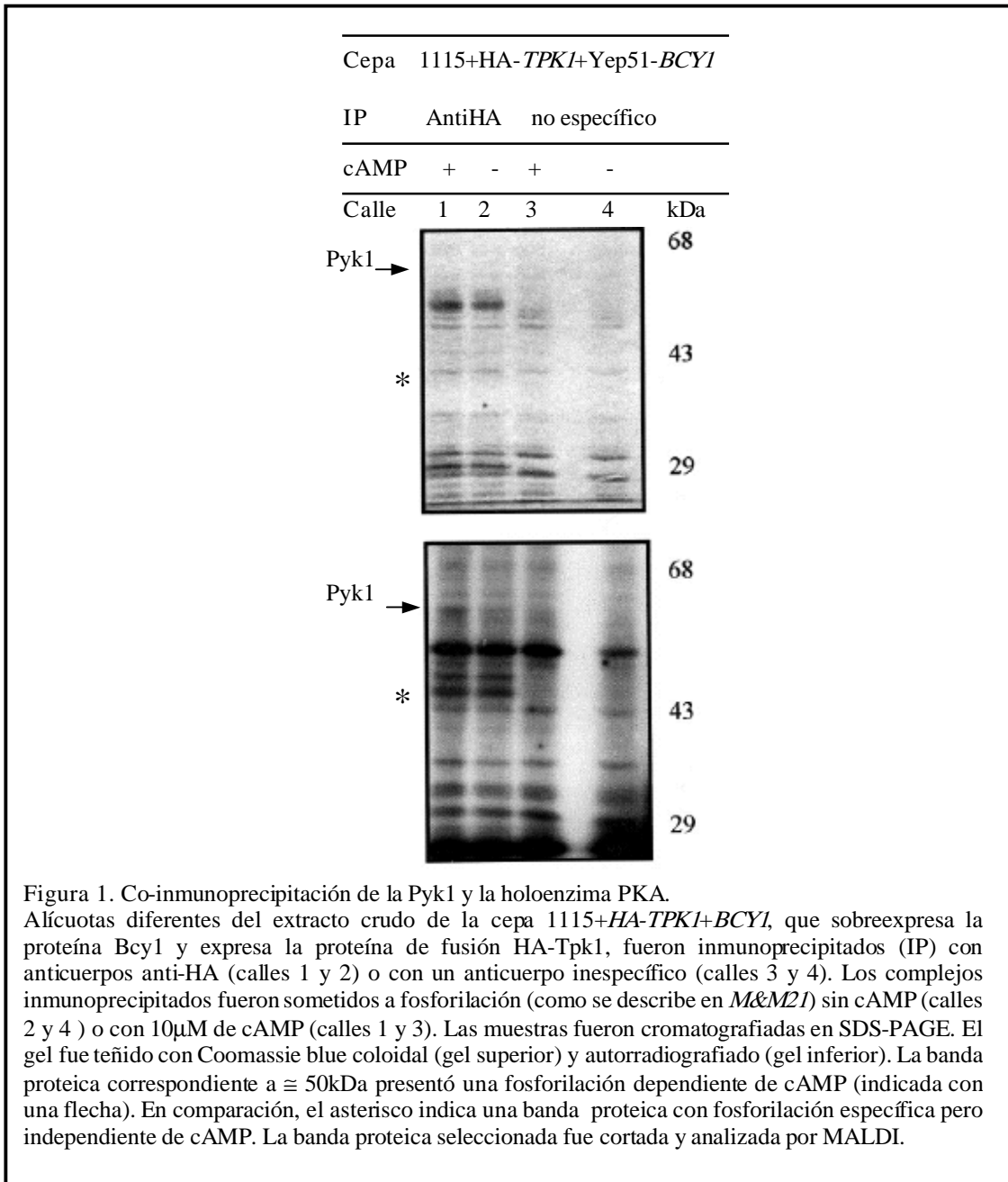
Esquema del complejo inmunoprecipitado:



Diferentes alícuotas de los inmunoprecipitados fueron sujetas a fosforilación por incubación con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  en presencia o ausencia de cAMP y se analizaron por SDS-PAGE. Se buscaron aquellas bandas proteicas co-inmunoprecipitadas específicamente que presentaran: 1) alta relación radioactividad/proteína y 2) fosforilación dependiente de cAMP. Los resultados en la Figura 1 muestran el gel teñido con Coomassie Blue (gel superior) y el patrón de fosforilación de las proteínas inmunoprecipitadas reveladas por autorradigrafía (gel inferior). Según el criterio de selección 1) se identificaron 6 bandas y una banda que cumplía con los criterios 1) y 2).

Se cortaron las bandas del gel y fueron identificadas por espectrometría de masa (MALDI) (este estudio fue realizado por el Dr Steven Howell, Laboratory of Protein Structure, National Institute for Medical Research, Reino Unido). Utilizando el espectro de masa MALDI de estas bandas, se realizó una búsqueda con el programa MASCOT utilizando un sub-grupo de datos no redundante del NCBI de *S. cerevisiae*.

Se identificaron: proteína ribosomal L2 (ORF correspondiente YBR031W), proteína ribosomal L3(YOR063W), proteína ribosomal L4 (YLL045C), TEF1A(YPR080W) (factor de elongación de la traducción), STM1 posible factor de transcripción (YLR150W), proteína ribosomal SP6 (YBR181C) y piruvato quinasa 1 (YAL038W).



De todas las proteínas identificadas la más interesante fue la piruvato quinasa 1 (Pyk1) por cumplir con los dos criterios de selección.

A pesar que la isoforma 2 no fue detectada en los inmunoprecipitados, y dada la similitud entre Pyk1 y la isoforma Pyk2, (68 % de identidad) (Boles *et al*, 1997), decidimos continuar el trabajo con ambas enzimas.

Fosforilación *in vitro* de la Pyk1 y Pyk2 por la PKA.

La fosforilación *in vitro* de Pyk1 y Pyk2 se ensayó utilizando dos fuentes enzimáticas de PKA: la isoforma 1 de la subunidad catalítica de *S. cerevisiae* (Tpk1p) y la subunidad catalítica de corazón bovino (C<sub>b</sub>).

Ambas isoformas de Pyk fueron purificadas a partir de cepas EJ758-*YAL038W* y EJ758-*YOR347C*, que expresan las proteínas de fusión GST-Pyk1 y GST-Pyk2 respectivamente. Ambos genes fueron secuenciados ya que los clones disponibles comercialmente no se encontraban verificados.

Las purificaciones se analizaron por SDS-PAGE y western-blot usando anticuerpos anti-GST o anti-Pyk (Figura 2). Se observó una banda de 84 kDa, correspondiente a ambas proteínas de fusión, detectada tanto por tinción con Coomassie blue (Figura 2A) o por western-blot utilizando un anticuerpo anti-GST (Figura 2B). La Figura 2C muestra que el anticuerpo dirigido contra la molécula entera de la Pyk de músculo de conejo (isoformas M1 y M2) presenta reacción cruzada con la Pyk1 pero no con Pyk2. Este resultado fue sorprendente, ya que ambas piruvato quinasas de levaduras son aproximadamente 45 % idénticas a las piruvato quinasas M1 y M2. Una posible explicación se desprende de comparar las regiones de secuencias no conservadas entre las piruvato quinasa (eucariotas superiores y *S.cerevisiae*), donde se observó mayor identidad entre la Pyk1 y las Pyks de conejo.

Utilizando preparaciones purificadas de GST-Pyk1 y GST-Pyk2 se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro*, por incubación con C<sub>b</sub> o preparaciones de HA-Tpk1 en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, La Figura 3 muestra que Pyk1 y Pyk2 fueron fosforiladas por la subunidad catalítica bovina (panel A y C) y de levaduras (panel B y D), siendo la reacción dependiente de la concentración de sustrato.

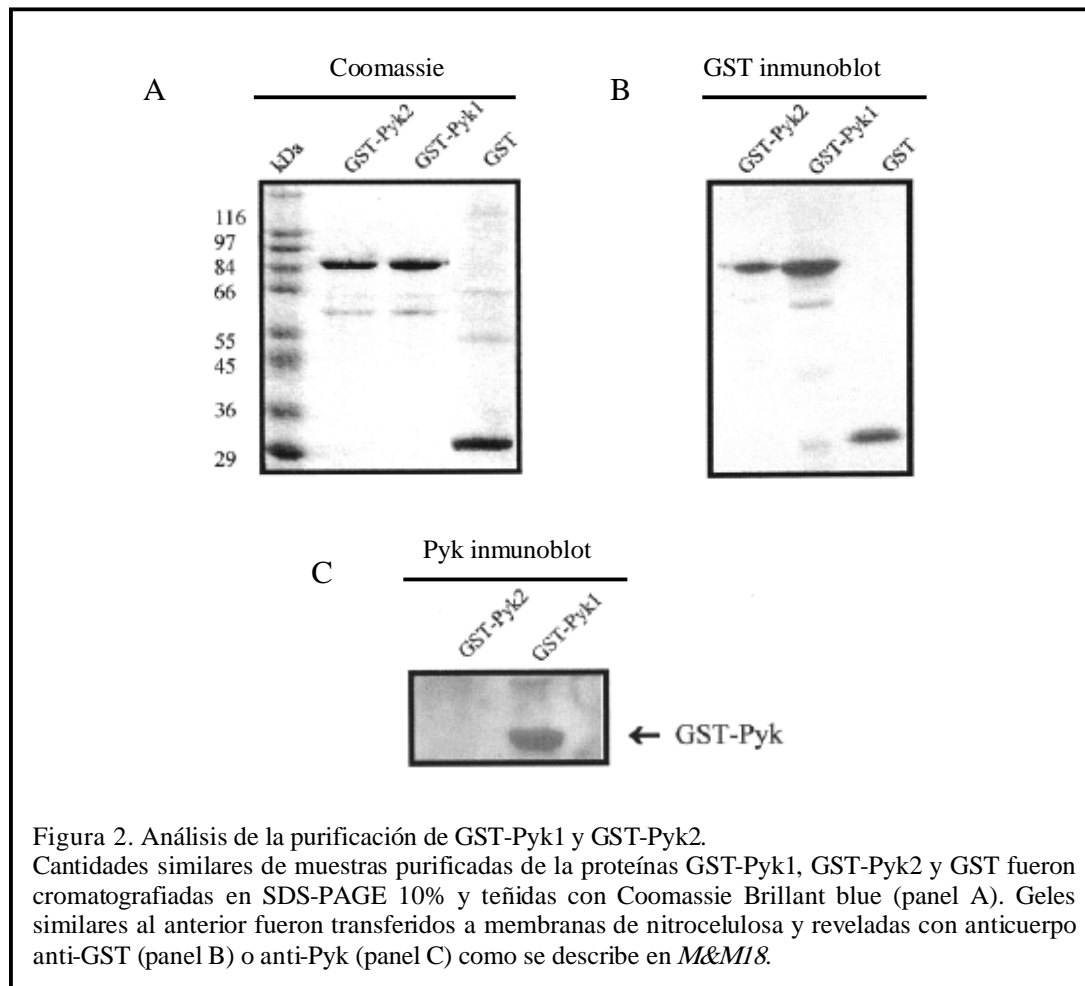
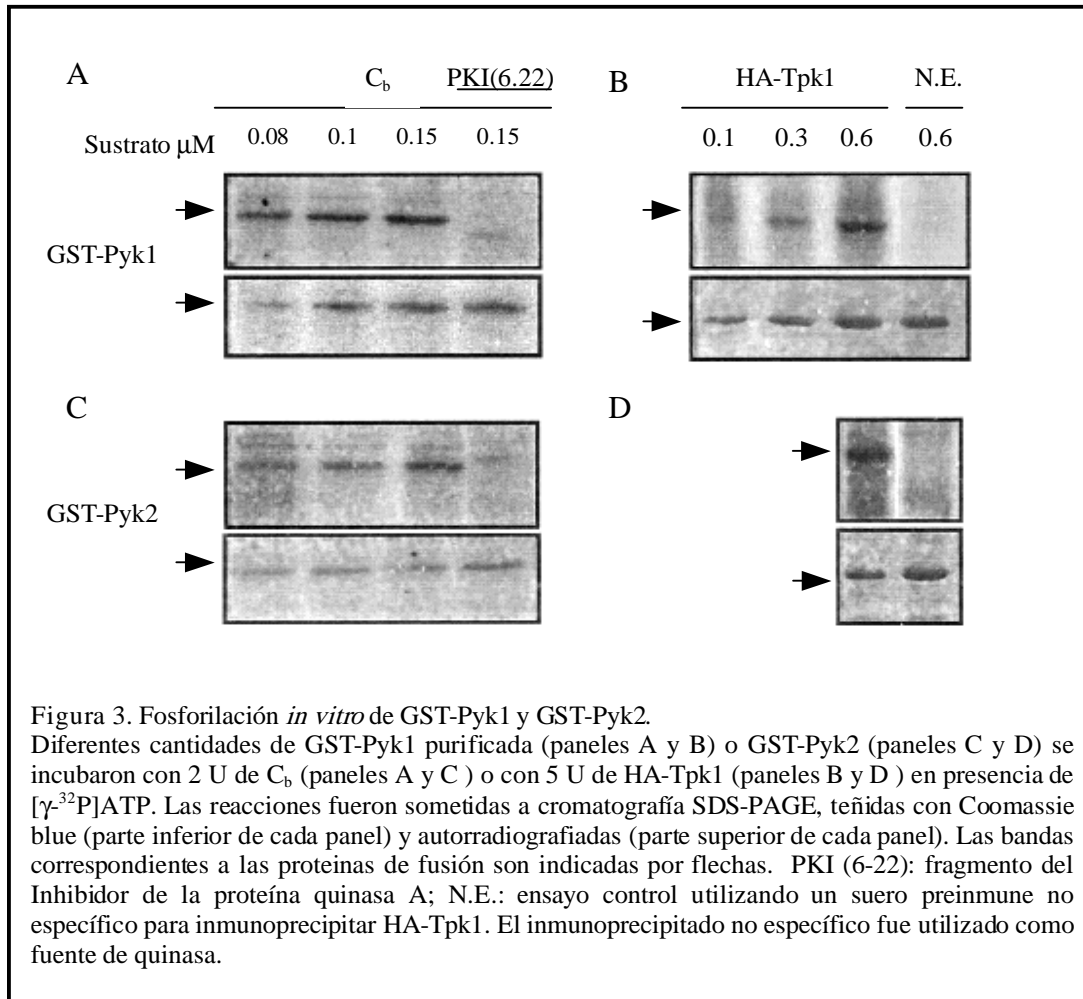


Figura 2. Análisis de la purificación de GST-Pyk1 y GST-Pyk2. Cantidades similares de muestras purificadas de las proteínas GST-Pyk1, GST-Pyk2 y GST fueron cromatografiadas en SDS-PAGE 10% y teñidas con Coomassie Brilliant blue (panel A). Geles similares al anterior fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa y reveladas con anticuerpo anti-GST (panel B) o anti-Pyk (panel C) como se describe en *M&M18*.

La fosforilación con Cb fue completamente inhibida en presencia del inhibidor peptídico específico para la proteína quinasa (PKI 6-22). Se ensayaron reacciones de fosforilación control utilizando anticuerpos no específicos para inmunoprecipitar HA-Tpk1 como fuente de PKA. La proteína GST no fue fosforilada por C<sub>b</sub> ni por Tpk1 (resultado no mostrado). Para corroborar la fosforilación de Pyk1 y Pyk2 por PKA de levaduras, se realizó una fosforilación *in vitro* utilizando extracto crudo de una cepa salvaje (*1115*) y de una cepa mutante de PKA (*tpk1<sup>w1</sup>*). La cepa *tpk1<sup>w1</sup>* posee una mutación en el gen *TPK1*, tal que la proteína está funcionalmente atenuada (Cameron *et al*, 1988). La calidad de la fuente

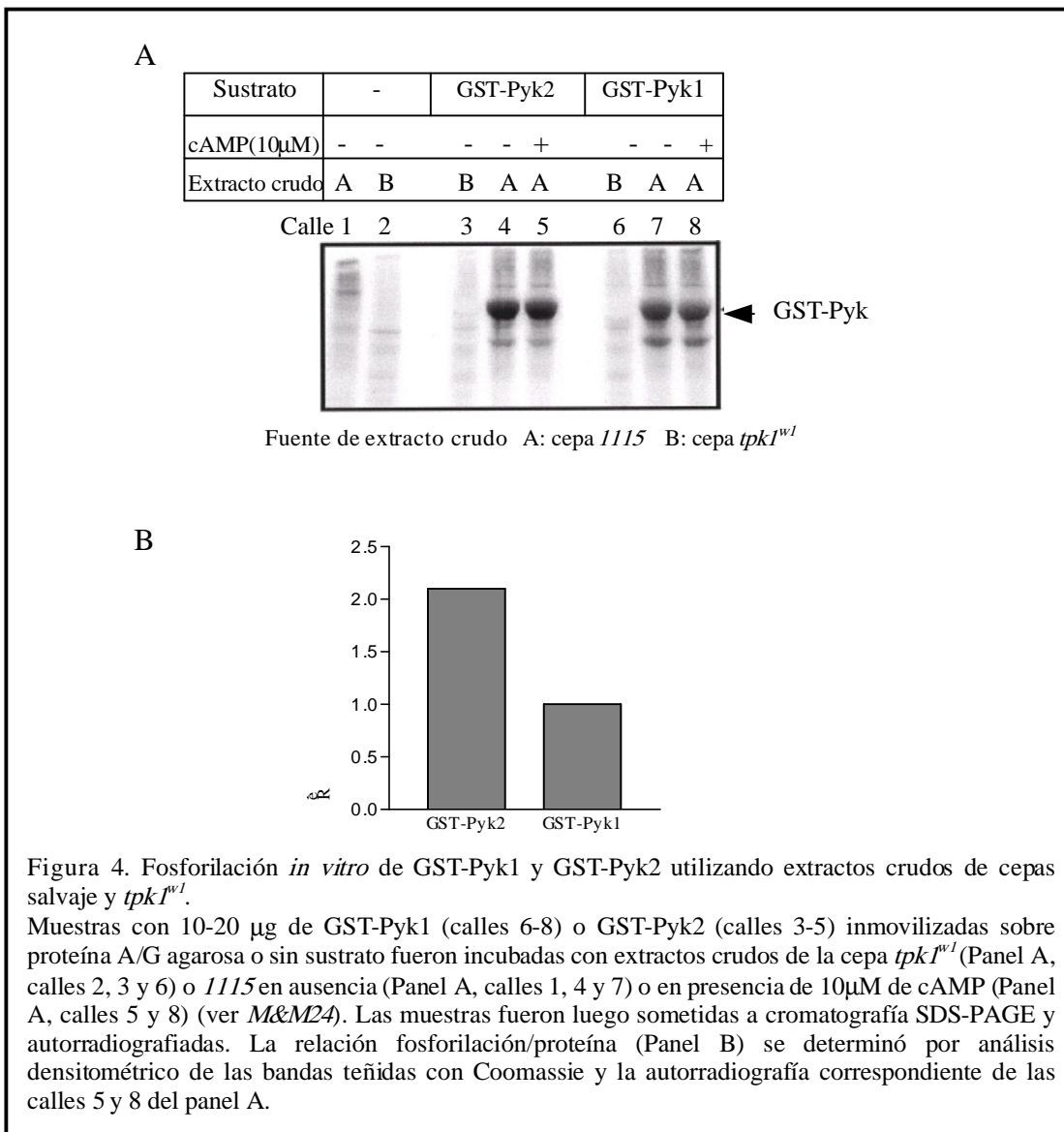
enzimática presente en los extractos crudos se determinó utilizando kemptido como sustrato en ausencia o presencia de cAMP.



El extracto de la cepa *1115* presentó una relación de actividad  $-/+$  cAMP de 0.2 y en la cepa *tpk1<sup>w1</sup>* no se detectó actividad quinasa tanto en extractos crudos como en células permeabilizadas (resultado no mostrado). Muestras semipurificadas de GST-Pyk1 y GST-Pyk2 fueron sometidas a fosforilación y luego las reacciones fueron analizadas por SDS-PAGE y autorradiografiadas (Figura 4 A).

La Figura 4 muestra que ambas proteínas son fosforiladas por extractos de la cepa *1115* y no por extractos *tpk1<sup>w1</sup>*, indicando que la fosforilación fue dependiente de PKA. La

reacción de fosforilación para la proteína GST-Pyk2, comparada con la proteína GST-Pyk1, fue más eficiente (Figura 4B). Bajo estas condiciones experimentales, la fosforilación de ambas proteínas de fusión no fue dependiente de cAMP. Este hecho, puede ser consecuencia de las condiciones de reacción ya que, bajo las condiciones empleadas en la Figura 1, donde la fuente de holoenzima fue el inmunoprecipitado de Tpk1 unida a Bcy1, se demostró que la fosforilación de la Pyk1 endógena fue dependiente de cAMP.





Resultados preliminares de Cytryńska *et al.* (2001) y Rayner *et al.* (2002) muestran que Pyk1 es fosforilada *in vitro* por Tpk2p y Tpk1p. Los resultados mostrados hasta aquí (Figura 1 y 3) indican que, las proteínas Pyk1 y Pyk2 son fosforiladas *in vitro* por Tpk1.

Reacción de fosforilación de las proteínas GST-Pyk1 y GST-Pyk2: Constantes cinéticas.

Se determinaron los parámetros cinéticos usando  $C_b$  como fuente de subunidad catalítica. Las proteínas GST-Pyk1 y GST-Pyk2 fueron utilizadas como sustratos inmovilizadas a resina A/G agarosa, debido al bajo rendimiento de las purificaciones.

Se ha descrito que, la cromatografía de afinidad de proteínas puede ser utilizada como un buen método para estimar la constante de unión (Martzen *et al.*, 1999 y Formosa *et al.*, 1991). Para esto se asume que, la proteína unida (en este caso la proteína GST-Pyk) se encuentra en equilibrio con el ligando en solución (en este caso  $C_b$ ) y que las interacciones de la proteína unida a la fase sólida con el ligando en la fase líquida son las mismas que las interacciones en el estado líquido.

La Figura 5 A muestra la fosforilación de GST-Pyk1 y GST-Pyk2 por  $C_b$  en función de la concentración de enzima. En el punto de máxima fosforilación, bajo estas condiciones experimentales,  $C_b$  catalizó la incorporación de 0.5 mol de fosfato/mol de GST-Pyk2 y 0.15 mol de fosfato/mol de GST-Pyk1.

Para determinar los parámetros cinéticos de la fosforilación de GST-Pyk1 y GST-Pyk2 por  $C_b$ , los experimentos fueron realizados usando concentraciones variables de ambas proteínas sustratos inmovilizadas en presencia de 2 unidades de  $C_b$  (Figura 5B). Experimentalmente no se alcanzó la  $V_{max}$  debido a que la concentración de sustrato resultó limitante.

El parámetro  $V_{max}/K_m$  que puede ser obtenido de la tangente al origen en las curvas de la Fig. 5 B (ver M&M) es el mejor parámetro para determinar la especificidad de una enzima por un sustrato. La tabla (Figura 5C) muestra las constantes de especificidad determinadas experimentalmente usando  $C_b$ . Cuando se comparan ambos sustratos, puede observarse que GST-Pyk2 resultó ser mejor sustrato para  $C_b$  que GST-Pyk1.

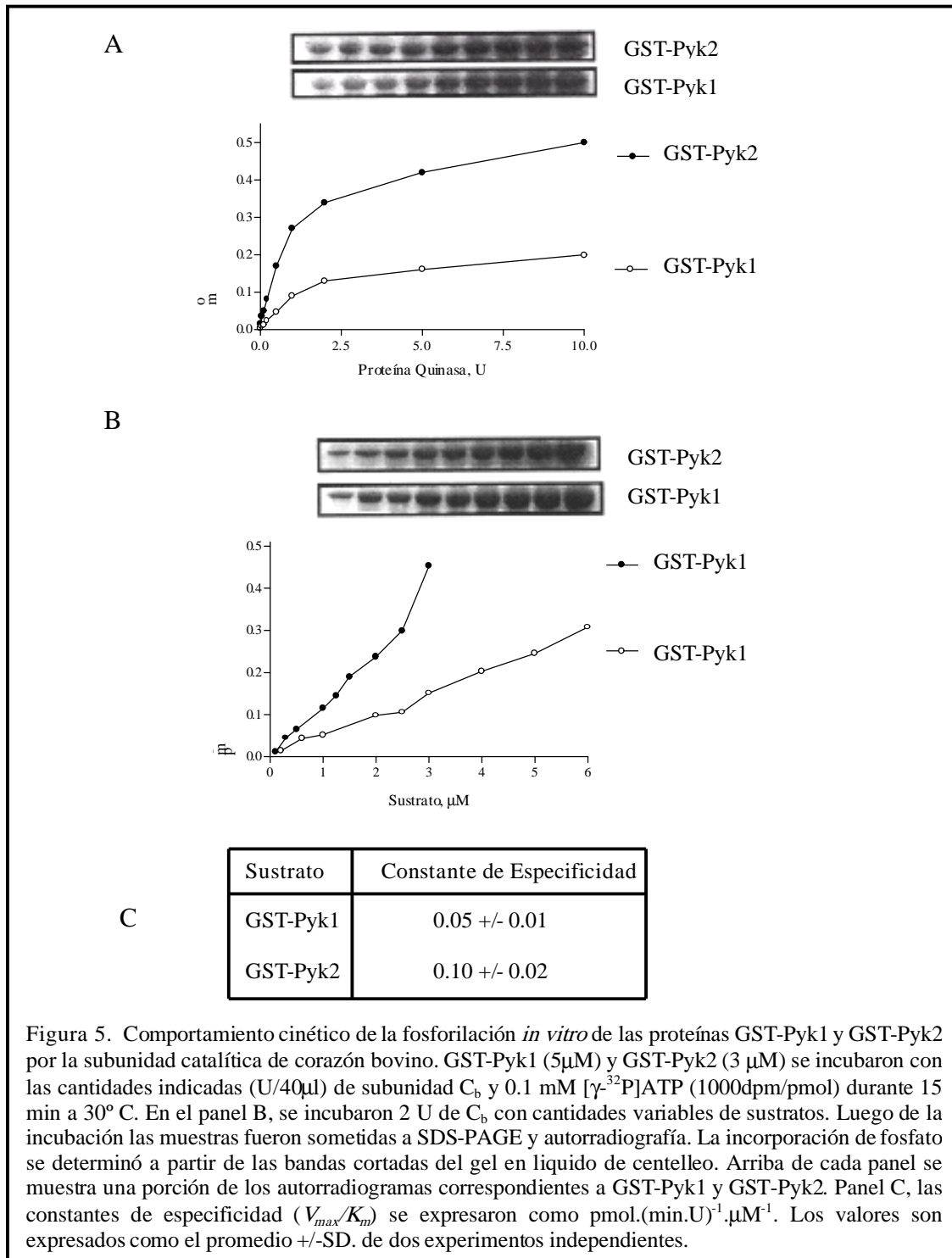


Figura 5. Comportamiento cinético de la fosforilación *in vitro* de las proteínas GST-Pyk1 y GST-Pyk2 por la subunidad catalítica de corazón bovino. GST-Pyk1 (5 $\mu$ M) y GST-Pyk2 (3  $\mu$ M) se incubaron con las cantidades indicadas (U/40 $\mu$ l) de subunidad C<sub>b</sub> y 0.1 mM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (1000dpm/pmol) durante 15 min a 30° C. En el panel B, se incubaron 2 U de C<sub>b</sub> con cantidades variables de sustratos. Luego de la incubación las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE y autorradiografía. La incorporación de fosfato se determinó a partir de las bandas cortadas del gel en líquido de centelleo. Arriba de cada panel se muestra una porción de los autorradiogramas correspondientes a GST-Pyk1 y GST-Pyk2. Panel C, las constantes de especificidad ( $V_{max}/K_m$ ) se expresaron como pmol.(min.U)<sup>-1</sup>. $\mu$ M<sup>-1</sup>. Los valores son expresados como el promedio +/-SD. de dos experimentos independientes.

Fosforilación *in vivo* de Pyk1 y Pyk2 por PKA.

Para demostrar la fosforilación endógena de Pyk1 y Pyk2 células de levaduras de la cepa salvaje y *tpk1<sup>w1</sup>* expresando GST-Pyk1 o GST-Pyk2 se marcaron metabólicamente con <sup>32</sup>P<sub>i</sub> (*M&M25*); luego se purificaron las proteínas GST-Pyk1 y GST-Pyk2 utilizando cromatografía glutation-agarosa.

Los resultados indican que GST-Pyk1 (Figura 6 A) y GST-Pyk2 (Figura 6 B) fueron fosforiladas *in vivo* y que la fosforilación fue dependiente de PKA, ya que no se encontró fosfoproteína GST-Pyk1 o GST-Pyk2 en la purificación que se realizó a partir de la cepa *tpk1<sup>w1</sup>* marcada metabólicamente.

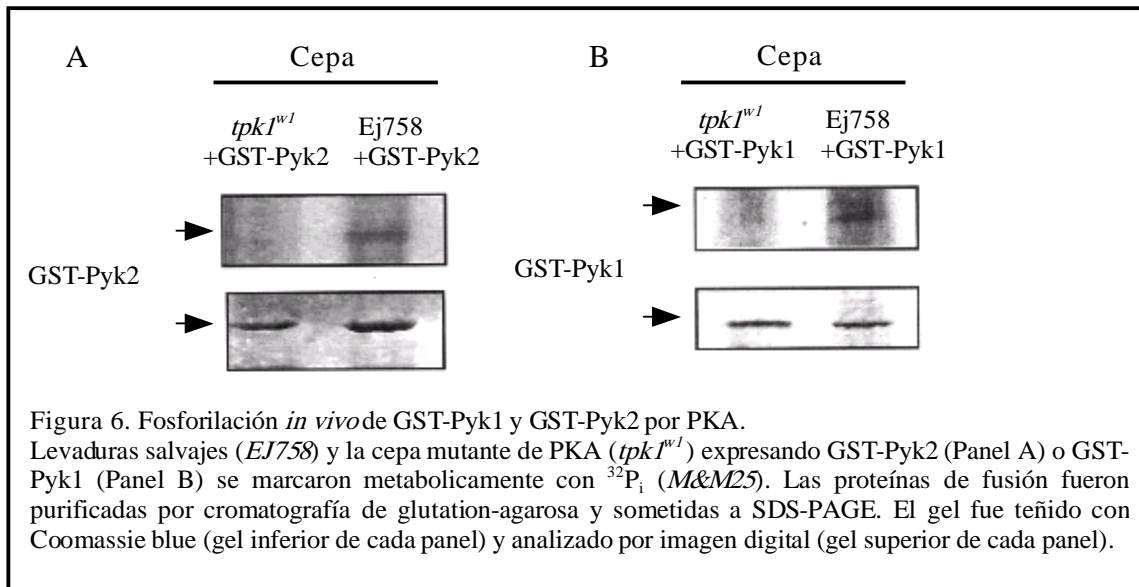
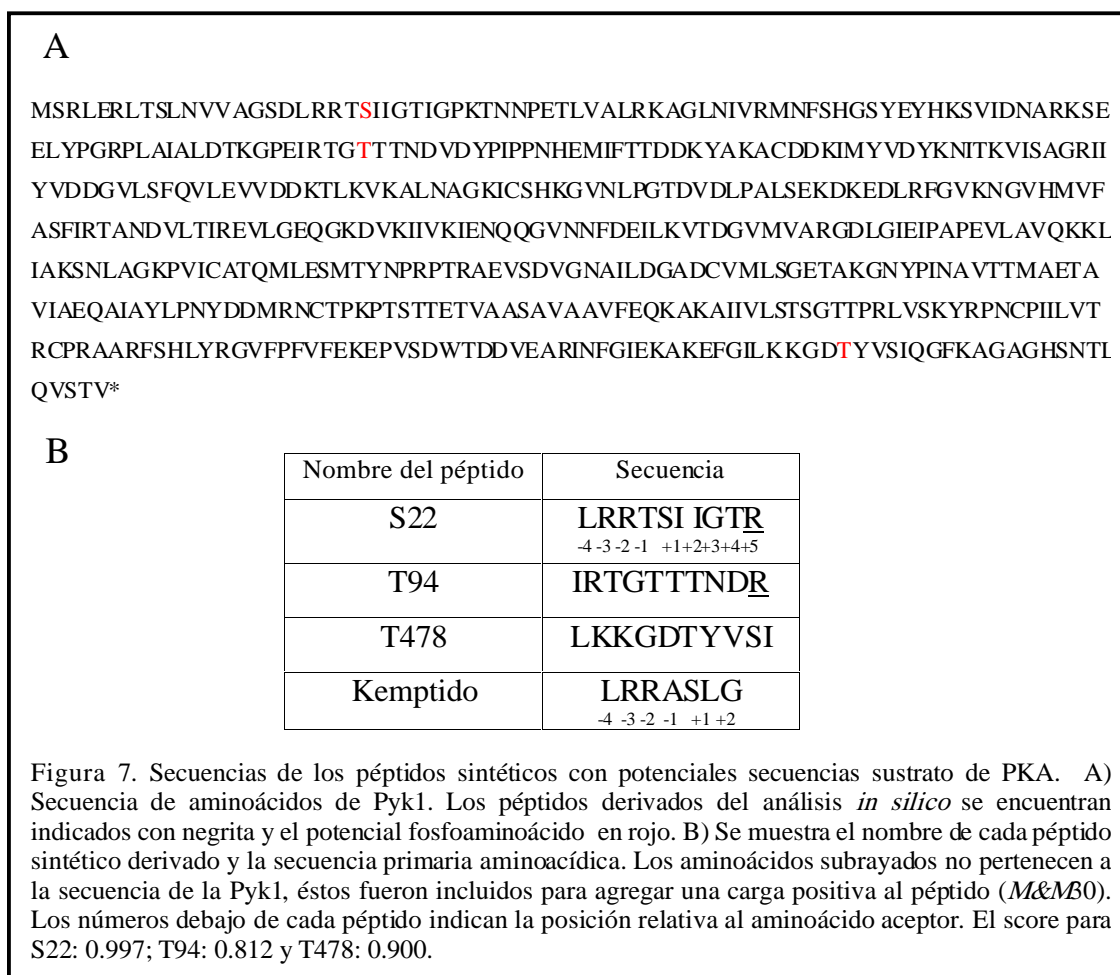


Figura 6. Fosforilación *in vivo* de GST-Pyk1 y GST-Pyk2 por PKA. Levaduras salvajes (*EJ758*) y la cepa mutante de PKA (*tpk1<sup>w1</sup>*) expresando GST-Pyk2 (Panel A) o GST-Pyk1 (Panel B) se marcaron metabólicamente con <sup>32</sup>P<sub>i</sub> (*M&M25*). Las proteínas de fusión fueron purificadas por cromatografía de glutation-agarosa y sometidas a SDS-PAGE. El gel fue teñido con Coomassie blue (gel inferior de cada panel) y analizado por imagen digital (gel superior de cada panel).

Sección II: Identificación del sitio de fosforilación en la Pyk1.

Búsqueda del sitio de fosforilación.

Habiendo demostrado la fosforilación *in vitro* e *in vivo* de Pyk1 y Pyk2 por PKA, se procedió, en primera instancia, a determinar el/los residuos blancos de fosforilación en Pyk1. La estrategia utilizada para hallar el /los posibles sitios de fosforilación en la Pyk1, consistió en la búsqueda de secuencias consenso con alta probabilidad de ser fosforilados por PKA, para lo cual se utilizó el programa Net-Phos ([www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos)).



A partir de este análisis, se diseñaron y sintetizaron péptidos los cuales fueron luego sometidos a fosforilación *in vitro* por PKA. La Figura 7 muestra la posición de los

potenciales péptidos sustratos derivados del análisis *in silico* en la estructura primaria de la Pyk1 y los péptidos diseñados a partir del análisis.

Los péptidos que contienen los potenciales sitios de fosforilación para PKA, fueron llamados: S22, T94 y T478 (las secuencias se encuentran detalladas en la Figura 7).

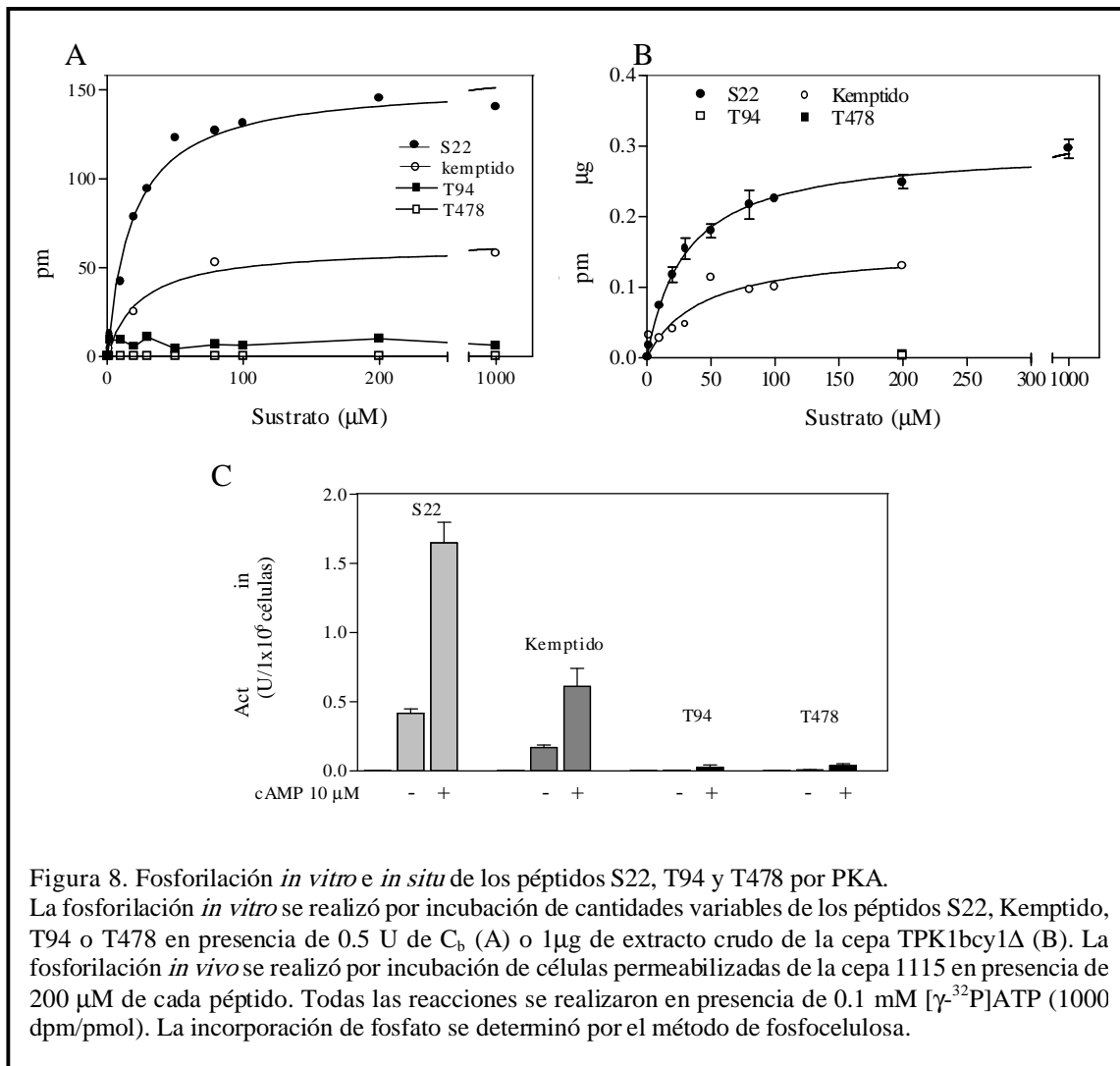
Para evaluar su comportamiento como sustratos, los péptidos y el kemptido (utilizado como péptido control) fueron sometidos a ensayos de fosforilación utilizando subunidad catalítica de corazón bovino y de *S. cerevisiae* como fuente de proteína quinasa.

La Figura 8 panel A, muestra que de los tres péptidos evaluados sólo el péptido S22 fue sustrato para C<sub>b</sub> *in vitro*. Los parámetros cinéticos derivados de las curvas de velocidad *versus* concentración de sustrato resultaron: S22:  $V_{max}$ :154 pmol/min.U,  $K_m$ :19 $\mu$ M ; kemptido:  $V_{max}$ :60 pmol/min.U,  $K_m$ : 23 $\mu$ M).

El mismo tipo de análisis se realizó con subunidad catalítica de *S. cerevisiae* (Tpk1p). Como fuente enzimática se utilizó extracto crudo de la cepa *TPK1bcy1 $\Delta$*  (Figura 10, panel B). Al igual que con C<sub>b</sub> de los tres péptidos sólo S22 fue fosforilado *in vitro*. El péptido S22 presentó  $V_{max}$ : 0.30 pmol/min. $\mu$ g,  $K_m$ :31 $\mu$ M, mientras que el kemptido  $V_{max}$ :0.15 pmol/min.  $\mu$ g,  $K_m$ :42 $\mu$ M.

La constante de especificidad, utilizando ambos tipos de subunidad catalítica, resultó tres veces mayor para el péptido S22 respecto del kemptido, lo que indica que la enzima presenta mayor eficiencia catalítica hacia el péptido S22. Esta diferencia puede deberse a que las secuencias primarias de ambos péptidos son diferentes, el péptido S22 posee dos residuos hidrofóbicos en las posiciones +1 y +2; mientras que el kemptido sólo en la posición +1 (Figura 7 B). Se ha descrito, estudiando la especificidad de la PKA con péptidos sintéticos, que es importante la presencia de un residuo voluminoso e hidrofóbico en la posición +1 (Loog *et al*, 1999). Posiblemente la presencia de un residuo hidrofóbico adicional mejore la estructura del péptido, aumentando su eficiencia como sustrato.

Con el objetivo de analizar la fosforilación de los péptidos por la PKA bajo condiciones fisiológicas, se realizó un ensayo con células permeabilizadas. Células de la cepa 1115 se incubaron con concentraciones saturantes de los péptidos en presencia o ausencia de cAMP 10 $\mu$ M (Figura 8, panel C). El péptido S22 resultó ser el único fosforilado *in situ* de manera dependiente de cAMP.



Efecto de la mutación en Ser22 sobre la fosforilación de la Pyk1.

En los resultados anteriores se demostró que el péptido S22 es el único sustrato de PKA *in vitro* e *in situ*, sugiriendo que la Ser22 es un potencial sitio de fosforilación en la proteína nativa Pyk1.

Si bien la fosforilación de determinados residuos en una proteína nativa dependen de la naturaleza química del sitio aceptor del fosfato y de la estructura primaria que los rodea, otros factores influyen sobre su especificidad como sustrato: exposición en la superficie del

sitio de fosforilación, la adquisición de una estructura secundaria más o menos favorable o la contribución de otros dominios en la proteína sustrato que afecten la interacción con el sitio activo de la quinasa.

Con el objetivo de analizar si la Serina 22 es blanco de fosforilación en la proteína nativapiruvato quinasa 1, se realizó la mutante PykS22A. Esta mutante posee una mutación de reemplazo, donde la Ser22 fue mutada a Ala. Además para confirmar si los residuos T94 y T478 que no fueron sustratos de PKA *in vitro* e *in situ* tampoco fueran sustratos cuando se encuentra dentro de la estructura proteica se realizó la mutante de uno de estos residuos, la PykT94A. La mutagénesis sitio-dirigida fue realizada sobre el vector pPYK101 y verificada por secuenciación (*M&M2*).

El plásmido pPYK101 contiene el gen de la *PYK1* bajo su propio promotor. Éste posee dos secuencias activadoras de la transcripción, UAS<sub>pyk1</sub> y UAS<sub>pyk2</sub>, las cuales permiten la sobreexpresión del gen en presencia de glucosa como fuente de carbono. Ambas construcciones y la versión salvaje fueron transformadas en la cepa *pyk1-5*. Esta cepa posee una mutación puntual en el gen *PYK1*, la cual evita la expresión cromosómica de la piruvato quinasa. La proteína piruvato quinasa 1 salvaje (llamada Pyk) y ambas mutantes PykS22A o PykT94A, fueron purificadas como se describe en *M&M3*. La calidad de la purificación se evaluó por medio de SDS-PAGE y western-blot utilizando un anticuerpo anti-Pyk. Se determinó la actividad piruvato quinasa de las preparaciones purificadas en presencia y ausencia del activador alostérico FBP, a concentraciones saturantes de PEP (*M&M26*); ninguna de las mutaciones realizadas en Pyk1 afectó drásticamente su actividad bajo las condiciones ensayadas (resultado no mostrado).

Se determinaron parámetros cinéticos de la fosforilación utilizando preparaciones purificadas de las enzimas: Pyk1S22A, Pyk1T94A y Pyk. Como fuente de subunidad catalítica se utilizó subunidad de corazón bovino (C<sub>b</sub>) (Figura 9, paneles A y B).

Como puede observarse, la mutante PykS22A no fue fosforilada *in vitro* por C<sub>b</sub>, mientras que la mutante PykT94A presentó valores cinéticos de fosforilación similares que la Pyk salvaje.

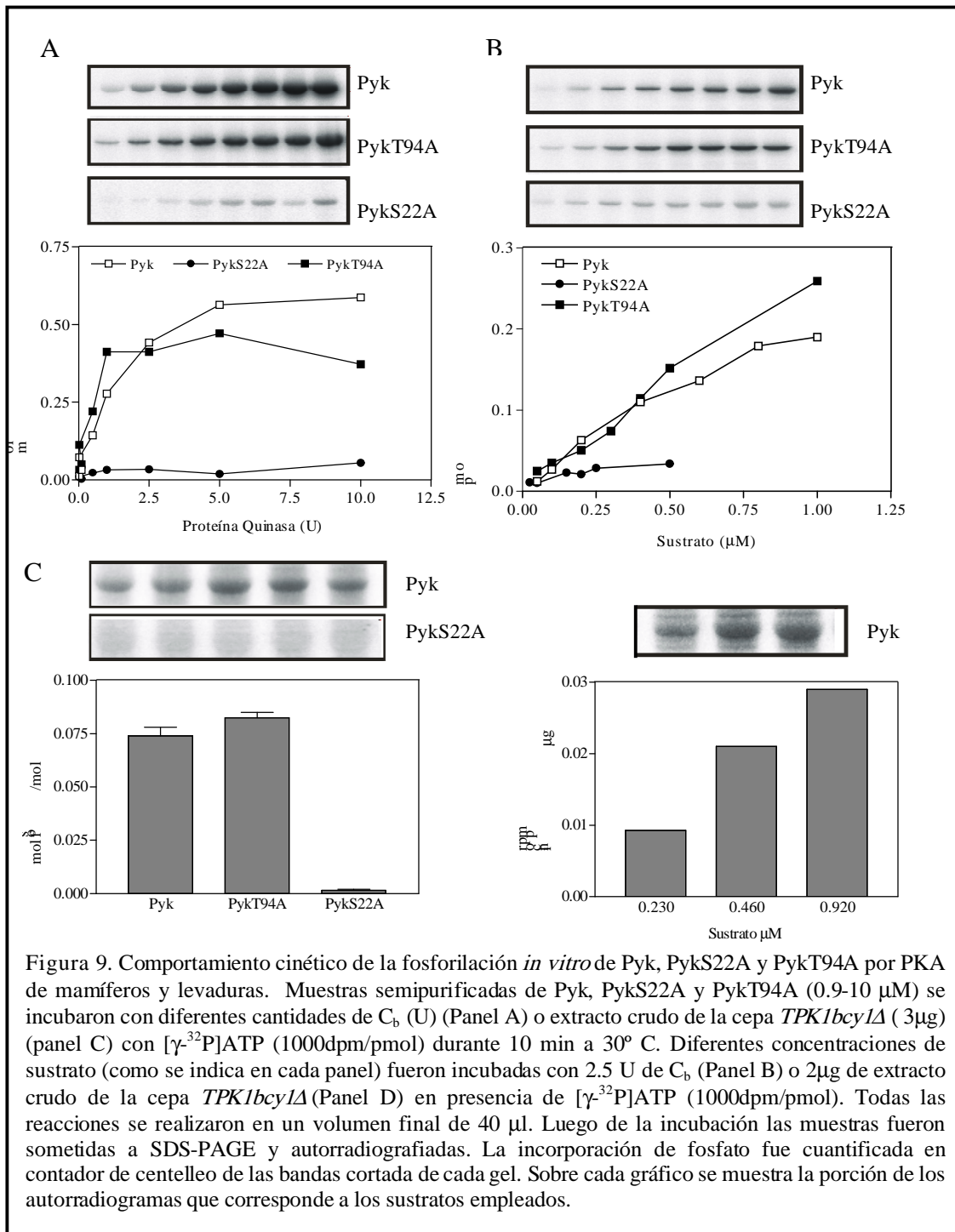


Figura 9. Comportamiento cinético de la fosforilación *in vitro* de Pyk, PykS22A y PykT94A por PKA de mamíferos y levaduras. Muestras semipurificadas de Pyk, PykS22A y PykT94A (0.9-10 μM) se incubaron con diferentes cantidades de C<sub>b</sub> (U) (Panel A) o extracto crudo de la cepa *TPK1bcy1Δ* (3 μg) (panel C) con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (1000dpm/pmol) durante 10 min a 30° C. Diferentes concentraciones de sustrato (como se indica en cada panel) fueron incubadas con 2.5 U de C<sub>b</sub> (Panel B) o 2μg de extracto crudo de la cepa *TPK1bcy1Δ* (Panel D) en presencia de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (1000dpm/pmol). Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 40 μl. Luego de la incubación las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE y autorradiografiadas. La incorporación de fosfato fue cuantificada en contador de centelleo de las bandas cortada de cada gel. Sobre cada gráfico se muestra la porción de los autorradiogramas que corresponde a los sustratos empleados.



Bajo condiciones de fosforilación máxima, PykT94A y Pyk presentaron un máximo de 0.4 y 0.5 mol de fosfato/mol de proteína respectivamente, compatible con 1 sitio de fosforilación por molécula de proteína (Figura 9, panel A). De los experimentos mostrados en la Figura 9 panel B, se estimaron las constantes de especificidad para ambas proteínas, resultando ser Pyk:  $0.20 \text{ pmol.U}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} / \mu\text{M}$  y PykT94A:  $0.24 \text{ pmol.U}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} / \mu\text{M}$ ; estos valores indican que ambas proteínas se comportan igual como sustrato y por lo tanto el residuo T94 no es blanco de fosforilación en la proteína nativa.

Los resultados de la Figura 9 indican que la mutación sobre Serina 22 elimina la fosforilación ejercida por  $C_b$  *in vitro*.

Para analizar la fosforilación de Pyk1 salvaje y mutante pero con la subunidad catalítica de *S. cerevisiae*, se realizó un experimento de fosforilación *in vitro* utilizando extracto crudo de la cepa *TPK1bcy1Δ*, como fuente enzimática. La Figura 9 panel C muestra que, bajo condiciones de fosforilación máxima, la Pyk y PykT94A fueron fosforiladas con la misma eficiencia, mientras que la mutante PykS22A no fue fosforilada. Bajo estas condiciones experimentales, la eficiencia de fosforilación fue muy baja, 0.075 mol fosfato/mol proteína; como consecuencia no se pudo estimar experimentalmente la constante de especificidad. Igualmente la Figura 9 panel D muestra que la reacción fue dependiente de la concentración de sustrato.

Los valores obtenidos de las constantes de especificidad para  $C_b$  obtenidos utilizando GST-Pyk1-glutación-agarosa (Figura 5, panel C) o Pyk purificada (Figura 9, panel B) resultaron dentro del mismo orden, lo que permite validar los experimentos utilizando el sustrato inmovilizado.

En conclusión, los resultados presentados en la Figura 9 indican que, el residuo serina 22 de la piruvato quinasa es el único sitio de fosforilación para PKA.

Análisis preliminar de la participación del sustrato en el mecanismo de activación de la holoenzima de levaduras.

Se conoce que el cAMP activa la holoenzima a través de la disociación de las subunidades, liberando subunidad catalítica que fosforila sustratos en residuos serina o treonina. Sin embargo, experimentos *in vitro* en los cuales se utilizan concentraciones de enzima de

mamíferos similares a la intracelular, han sugerido que el cAMP sólo no disocia completamente la holoenzima, y el complejo ternario C-R-cAMP podría ser estable dentro de la célula (Johnson *et al*, 1993; Yang *et al*, 1995; Kopperud *et al*, 2002).

Recientemente, se ha demostrado para PKA tipo I y II, que la holoenzima frente un exceso de cAMP se disocia sólo un porcentaje, y que el agregado de kemptido logra la máxima disociación (Vigil *et al*, 2004). Esto también fue observado *in vitro* en PKA de *Mucor rouxii*, donde la presencia de diferentes sustratos peptídicos provocó una activación diferencial de la holoenzima en presencia de cAMP (Zaremborg *et al*, 2000).

Generalmente se han empleado sustratos péptídicos, pero el uso de proteínas nativas permitiría analizar cómo los aspectos estructurales de éstas influyen sobre su especificidad como sustratos y su participación en el mecanismo de activación de la holoenzima.

Un modelo interesante para este objetivo, es utilizar una proteína nativa y el péptido derivado de ella. Cabe aclarar que el empleo de sustratos nativos impide el uso de células permeabilizadas como fuente de PKA, ya que debido al peso molecular no se garantiza la libre difusión al interior celular.

Sin embargo, se ha observado en *M.rouxii* que la activación por análogos del cAMP y especificidad de sustrato de la PKA fue similar cuando se emplearon células permeabilizadas y alta concentración de extracto crudo (fuera de la linealidad actividad quinasa *versus* concentración enzimática) (Sorol, *et al* 2001).

Con el objetivo de evaluar, de manera preliminar, el efecto del sustrato en el proceso de activación de la holoenzima dependiente de cAMP *in vitro*, se determinó la concentración de cAMP para producir el 50% de disociación de la holoenzima ( $A_{0.5}$ ) en presencia de una concentración fija de sustrato. Este tipo de experimento, se realizó utilizando aproximadamente 15 µg/ml de extracto crudo como fuente de holoenzima. La Figura 10 muestra la dependencia de la actividad PKA ensayada con concentraciones variables de cAMP en presencia del péptido S22 y la piruvato quinasa.

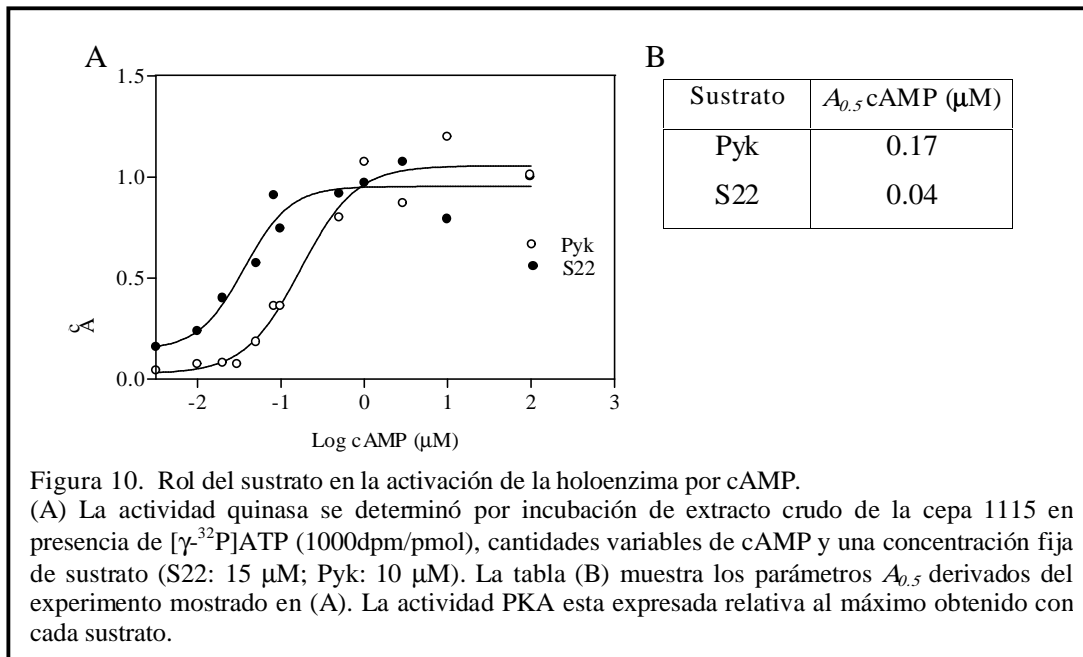


Figura 10. Rol del sustrato en la activación de la holoenzima por cAMP. (A) La actividad quinasa se determinó por incubación de extracto crudo de la cepa 1115 en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (1000dpm/pmol), cantidades variables de cAMP y una concentración fija de sustrato (S22: 15  $\mu\text{M}$ ; Pyk: 10  $\mu\text{M}$ ). La tabla (B) muestra los parámetros  $A_{0.5}$  derivados del experimento mostrado en (A). La actividad PKA esta expresada relativa al máximo obtenido con cada sustrato.

Como puede observarse, el valor  $A_{0.5}$  estimado no fue el mismo cuando se utilizaron dos sustratos diferentes como Pyk y el péptido S22. Esto significa que, la disociación de la holoenzima por cantidades crecientes de cAMP presentes en la reacción depende de la naturaleza estructural del sitio consenso.

En la Figura 10 tabla B se observa que el péptido Ser22 produce una disminución del  $A_{0.5}$  respecto a la proteína Pyk, sugiriendo que éste sería mejor activador en el proceso de disociación de la holoenzima. A pesar que la proteína nativa posee los mismos determinantes aminoacídicos dentro de la secuencia consenso que rodea a la Serina 22, el efecto producido resultó diferente.

Efecto de la fosforilación sobre la actividad de la piruvato quinasa.

Con el objetivo de analizar si la fosforilación de Pyk tiene algún efecto sobre su actividad, se utilizaron dos abordajes: un abordaje genético clásico y otro utilizando la proteína mutante del sitio de fosforilación. Se determinaron los parámetros cinéticos ( $V_{max}$  y  $K_m$ ) en presencia o ausencia del activador FBP.

El primer abordaje consistió en determinar la actividad en preparaciones semipurificadas de Pyk a partir de cepas con diferente grado de actividad de PKA. En el extremo superior de la escala, se utilizó la cepa *1451*, la cual posee una mutación en el gen *BCY1* (*bcy1-14*), que provoca una holoenzima con actividad constitutivamente alta, casi independiente de cAMP. Se ha demostrado previamente (Zarembeg y Moreno, 1996 y Portela *et al*, 2001) que la cepa *1451*, comparada con la cepa *1115*, presenta mayor severidad en los fenotipos clásicos dependientes de PKA, tales como acumulación de glucógeno, capacidad respiratoria y crecimiento a 37° C.

Continuando en orden de actividad PKA decreciente, utilizamos la cepa salvaje *1115* y finalmente, la cepa *tpk1<sup>w1</sup>* se utilizó como extremo inferior en la escala ya que presenta una actividad PKA muy reducida.

Utilizando estas cepas, esperabamos obtener diferencias en la actividad Pyk a consecuencia de diferentes grados de fosforilación por PKA.

Se ha reportado que la expresión del mRNA de Pyk1 es dependiente de la presencia de glucosa en el medio de crecimiento, disminuyendo durante el crecimiento diauxico (Moore *et al*, 1991 y DeRisi *et al*, 1997). Antes de medir actividad Pyk presente en las distintas cepas, determinamos el nivel de expresión de la Pyk en dos estadios de crecimiento sobre YPD: fase exponencial y estacionaria (resultados no mostrados).

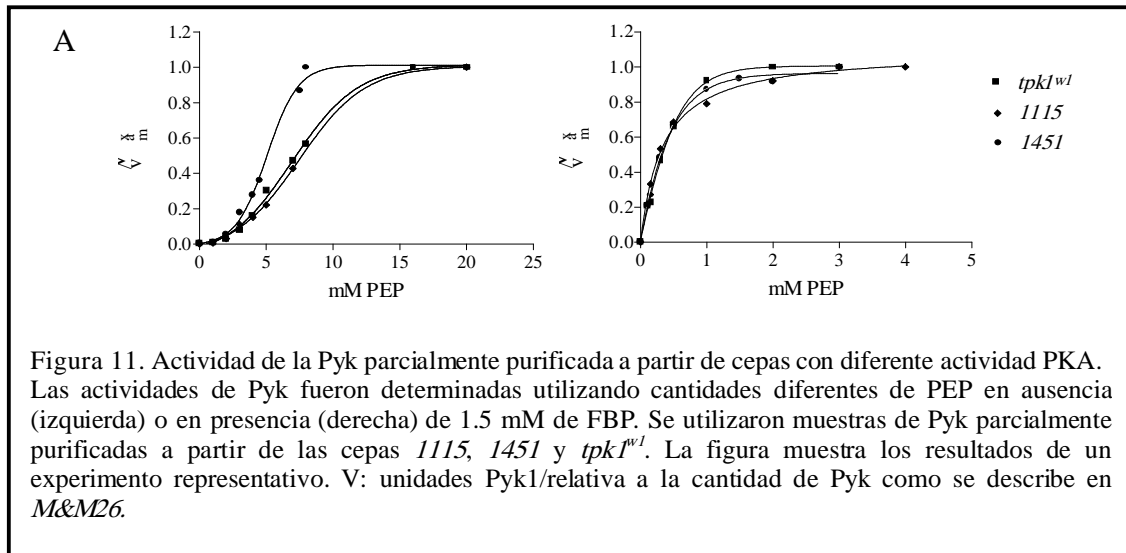
Se determinó la actividad específica (unidades por miligramo de proteína total) de Pyk en ambos estadios a través de la determinación de la actividad catalítica en ausencia/presencia de FBP y los niveles de proteína mediante western-blot. Los resultados indicaron que la actividad específica fue máxima en fase exponencial (resultados no mostrados).

De acuerdo a estos resultados y sabiendo que bajo estas condiciones de crecimiento no hay expresión de Pyk2 (Boles *et al*, 1997), se realizaron los experimentos cinéticos utilizando preparaciones semipurificadas de Pyk de células en estado crecimiento pre-diauxico.

Se analizó el comportamiento cinético de Pyk semi-purificada de cada cepa con PEP en presencia y ausencia de FBP (Figura 11). En todos los casos, no se observaron cambios significativos en la  $V_{max}$  tanto en presencia como ausencia de FBP.

Además, no se encontraron diferencias significativas en la afinidad hacia el PEP en presencia del activador alostérico FBP (Figura 11, panel derecho).

Sí encontramos diferencias en ausencia de FBP (Figura 11, panel izquierdo). Los parámetros cinéticos derivados de las curvas del plot de Hill representadas en las curvas de la Figura 11 panel izquierdo indicaron que la piruvato quinasa derivada de la cepa *1451* presentó mayor cooperatividad.



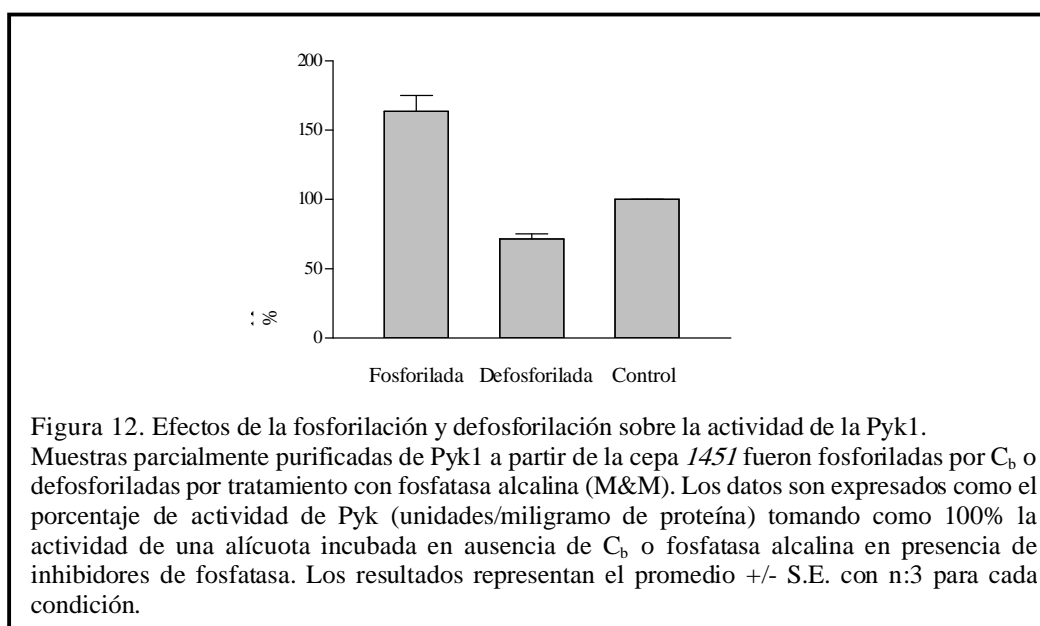
Para la cepa *1451* se observó un incremento en el  $n_H$  y una disminución en el  $K_{0.5}$  para el PEP ( $K_{0.5}$  (PEP)mM: 5.4;  $n_H$ : 3.1) respecto de las cepas *1115* y *tpk1<sup>wl</sup>* ( $K_{0.5}$  (PEP)mM: 7.5-8;  $n_H$ : 2.6-2.5).

Entonces, los parámetros de la enzima derivada de la cepa *1451* la cual se encuentra presumiblemente mas fosforilada, indican una piruvato quinasa mas activa.

No se observaron cambios significativos en los parámetros cinéticos medidos en ausencia de FBP entre las preparaciones de Pyk derivadas de las cepas *1115* y *tpk1<sup>wl</sup>*. Este resultado puede interpretarse de manera que el grado de moléculas fosforiladas sea bajo cuando se toman muestras de las células creciendo exponencialmente, a diferencia de la cepa *1451* donde la PKA se encuentra constitutivamente activada y el grado de fosforilación de los sustratos se presume sostenido.

Para confirmar estos resultados, examinamos el efecto de la actividad de PKA y de la fosfatasa alcalina sobre la actividad de la Pyk. Preparaciones de Pyk1 de la cepa *1451* fueron incubadas con  $C_b$  o con fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina usada se eliminó de

la reacción por magneto-precipitación (ver *M&M27*) evitando así la interferencia en el ensayo posterior. La actividad de la Pyk fue determinada en preparaciones enzimáticas fosforiladas y defosforiladas utilizando 8 mM PEP, concentración a la cual se observó mayor diferencia de actividad Pyk (ver Figura 11). Los resultados mostrados en la Figura 12, indican que el tratamiento con la fosfatasa alcalina redujo en un 35% la actividad de la Pyk, comparándola con preparaciones que fueron tratadas con inhibidores de fosfatasa. Este resultado indica que la Pyk1 de la cepa *1451* fue fosforilada y que el tratamiento con fosfatasa alcalina produce la pérdida de fosfatos con la concomitante pérdida de actividad, como es el caso de la Pyk1 desde la cepa *tpk1<sup>wl</sup>*. El tratamiento opuesto, la fosforilación de Pyk1 con  $C_b$ , provocó en un efecto estimulante sobre la actividad de la Pyk1, comparado con el control, aumentando 1.6 veces la actividad (Figura 12). Este resultado indica una correlación positiva entre estado de fosforilación de Pyk y actividad. Además, muestran que las preparaciones de Pyk1 de la cepa *1451* no se encontraban fosforiladas al máximo.



Los resultados anteriores (Figuras 11 y 12), indicaron una correlación positiva entre estado de fosforilación de Pyk1 y actividad PKA. Con el objetivo de poner a prueba si la mutación sobre la Ser22 es importante para modular la actividad de la Pyk se determinó la actividad

enzimática en muestras de Pyk1 y PykS22A. La Figura 13 muestra que el parámetro cinético  $K_{0.5}$ , en ausencia de FBP, resultó mayor para la Pyk mutante. No se observaron cambios significativos en presencia de FBP (resultado no mostrado). El cambio en la constante  $K_{0.5}$ , sugiere que la Pyk mutante posee menor afinidad hacia el PEP.

En conclusión, la fosforilación en el residuo Ser22 tiene un efecto positivo sobre la regulación de la actividad Pyk1.

| Enzima  | $V_{max}$ | $K_{0.5}$ (PEP, mM) | $n_H$ |
|---------|-----------|---------------------|-------|
| Pyk1    | 4.3       | 6.8                 | 2.7   |
| PykS22A | 4.8       | 10.2                | 2.3   |

Figura 13. Parámetros cinéticos de Pyk mutante y salvaje.

La tabla muestra los parámetros cinéticos derivados de las determinaciones de la actividad de la Pyk salvaje y mutante Pyk1S22A, en función de la concentración de PEP en ausencia de FBP.

### 3.5) Discusión

#### *Identificación de dos sustratos de PKA: Pyk1 y Pyk2. Identificación de la serina 22 como sitio de fosforilación en Pyk1.*

En el presente capítulo se identificaron y caracterizaron dos sustratos de PKA de *Saccharomyces cerevisiae*: Pyk1 y Pyk2. Se ha demostrado la fosforilación de estos sustratos tanto *in vitro* como *in vivo*. Pyk1 y Pyk2 fueron sustratos *in vitro* para Tpk1p o C<sub>b</sub>, indicando que las dos isoformas de Pyk son sustratos de ambos tipos de PKA. Se ha reportado previamente que la PKA de levaduras y mamíferos reconocen determinantes específicos similares en los péptidos sustrato (Denis *et al*, 1991).

La estequiometría de la reacción de fosforilación *in vitro* obtenida utilizando subunidad catalítica de corazón bovino (Figura 5) para Pyk1-GST o Pyk2-GST resultó compatible con un sitio de fosforilación por molécula de piruvato quinasa.

La fosforilación de Pyk1-GST y Pyk2-GST por la PKA de levaduras *in vitro* usando extractos crudos de las cepas WT y *tpk1<sup>w1</sup>* como fuente de proteína quinasa (Figura 4), indicó que ambas isoformas son sustrato de PKA.

Además, se demostró que las GST-Pyks recombinantes, son sustrato de PKA *in vivo* (Figura 6).

En eucariotas superiores se han reportado varias quinasas responsables de la multifosforilación de la piruvato quinasa (Kumar *et al*, 2002). Del análisis de la secuencia de Pyk1 para hallar potenciales sitios de fosforilación de PKA, se encontraron tres sitios probables, correspondientes a las posiciones Serina 22, Treonina 94 y Treonina 478; la secuencia del péptido S22 se encuentra también en Pyk2. A partir de esta predicción se sintetizaron péptidos con el objetivo de determinar el/los sitios blanco de fosforilación. Los resultados de la Figura 8 indicaron que sólo el péptido conteniendo S22 fue sustrato de PKA.

Se determinó la fosforilación *in vitro* de la mutante PykS22A, en el cual el aminoácido serina 22 fue reemplazado por alanina (Figura 9). Esta mutante no fue fosforilada *in vitro* por subunidad catalítica de corazón bovino ni por Tpk1p, indicando que este sitio es el único blanco de fosforilación por PKA.



Se ha reportado, analizando el perfil proteico de células de levaduras creciendo exponencialmente en YPglu, que la Pyk1 puede ser visualizada por isoelectroenfoque como cuatro isoformas diferentes con distintos puntos isoelectrónicos sugiriendo múltiples sitios de fosforilación por molécula (Gygi *et al*, 1999). Asumiendo que las isoformas son consecuencia de diferentes estados de fosforilación de la Pyk1 y que ésta posee sólo un sitio blanco para PKA, al igual que en organismos eucariotas superiores, la Pyk1 de *S. cerevisiae* estaría sujeta a regulación por fosforilación de varias proteínas quinasas.

La constante de especificidad de C<sub>b</sub> para GST-Pyk2 fue mayor que para la GST-Pyk1 (0.1 *versus* 0.05) (Fig. 5 C). Se encontró una preferencia similar de sustrato para la PKA de levaduras, ya que los experimentos de la Fig. 4B indican una relación fosforilación/proteína mayor para la proteína GST-Pyk2.

Analizando la estructura cristalizada de la Pyk1, el péptido consenso LRRTSIIG se encuentra localizado en la interfase formada por el dominio catalítico A y el dominio regulatorio (Jurica *et al*, 1998). Utilizando las coordenadas del cristal de la Pyk1, se modeló la estructura de la Pyk2. Se realizó un análisis detallado de la conformación del péptido dentro de la estructura tridimensional de ambas Pyk y se estimó la accesibilidad al solvente de cada residuo del péptido consenso (Rost *et al*, 1992). Este análisis indicó, para ambas isoformas de la Pyk, que la porción comprendida por los residuos LRRTS se encuentra mas expuesta, mientras que IIGT está menos expuesto a la superficie. Además, se observó que el grado de exposición de los residuos RR, en la isoforma Pyk2 sería mayor que en la isoforma Pyk1.

Varios determinantes específicos contribuyen al reconocimiento de sustratos e inhibidores por parte de la subunidad catalítica. Los residuos más importantes son aquellos que se encuentran ubicados en las posiciones P-6, P-3, y P-2,; los cuales son ocupados por residuos Argininas (Kemp *et al*, 1975; Zetterqvist *et al*, 1990; Moore *et al*, 2003). Posiblemente, la diferencia en la eficiencia de catálisis de la subunidad catalítica entre Pyk1 y Pyk2 reside en la exposición diferencial de los residuos RR en el marco de la estructura nativa de la proteína.

---

*Análisis de las propiedades funcionales de un sustrato nativo versus un sustrato peptídico.*

La efectividad de la fosforilación por proteínas quinasas se ha basado sobre la estructura primaria que rodea al aminoácido fosfo-aceptor. Sin embargo, el análisis estadístico de los sitios de fosforilación de sustratos naturales reveló que la probabilidad de encontrar una secuencia con dos (o más) aminoácidos conservados es baja. Se puede pensar entonces que la especificidad de la proteína quinasa no solo se basa en la secuencia primaria de un péptido determinado sino que está gobernada por la suma de varios factores: especificidad del aminoácido, especificidad de la secuencia del sitio de fosforilación, estructura secundaria y accesibilidad del sitio (Kreegipuu *et al*, 1998).

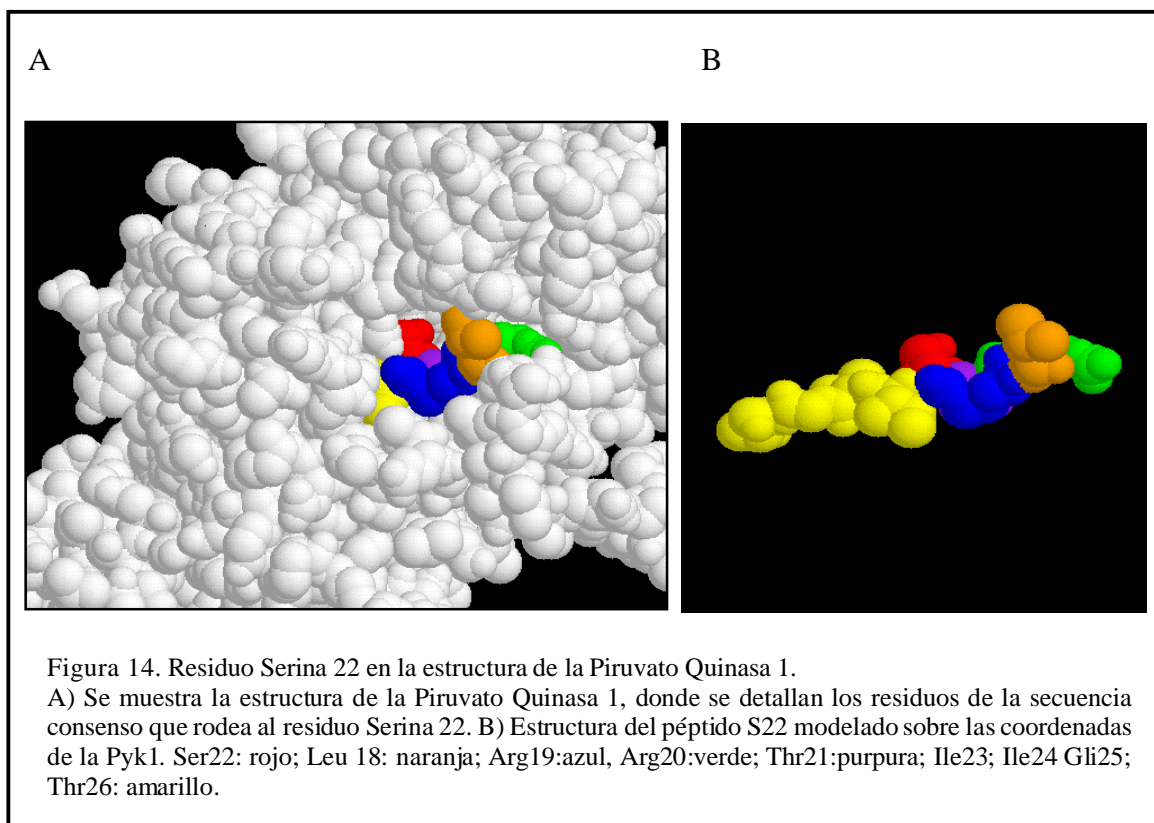
Aquí evaluamos dos propiedades funcionales de los sustratos de PKA: la calidad como sustrato, a través de la determinación de la constante de especificidad y el rol durante el proceso de activación, determinando la concentración de cAMP para producir el 50% de disociación de la holoenzima PKA.

La comparación de las constantes de especificidad entre S22 y Pyk indican que el péptido es fosforilado con mayor eficiencia ( $0.12 \text{ pmol. U}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} / \mu\text{M}$  para el péptido S22 *versus*  $0.20 \text{ pmol. U}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} / \mu\text{M}$  para la proteína Pyk). Esta diferencia significaría que, la estructura macromolecular de la proteína entera tendría influencia sobre la efectividad de la reacción de fosforilación.

Se ha planteado que muchos sustratos naturales de la PKA no siempre son mejores que los péptidos derivados de éstos o péptidos empleados como modelos porque, aunque presenten los mismos determinantes aminoacídicos, la disposición espacial del sitio de fosforilación en la estructura proteica del sustrato parecería encontrarse más restringida (Walsh *et al*, 1992).

De la figura 10, puede observarse que el sustrato peptídico y el sustrato nativo presentan diferentes efectos sobre la activación dependiente de cAMP de la holoenzima. El péptido parecería presentar mayor efectividad en el proceso de activación de la PKA.

La Figura 14 A, muestra la estructura del monómero de la Pyk1; en B se encuentra el péptido S22 modelado sobre la estructura de Pyk1. La predicción de la estructura secundaria del péptido S22 indicó que los residuos alrededor de la Ser22 forman estructura



del tipo lámina  $\beta$ , siendo ésta similar a la que presenta el péptido dentro de la estructura nativa de la Pyk1.

Como puede observarse en la Figura 14, el grado de exposición de la Serina 22 y de otros residuos que rodean a este aminoácido, podría justificar molecular y estructuralmente las diferentes propiedades funcionales encontradas entre Pyk1 y S22.

Estos estudios preliminares, utilizando un sustrato nativo y un péptido derivado de éste, permiten analizar cómo las diferencias estructurales influyen sobre su comportamiento cinético, indicando que la descripción de la especificidad de sustratos para la PKA requiere del empleo de sustratos nativos, donde se considera la estructura espacial del sitio de fosforilación.

*La fosforilación de la piruvato quinasa 1 aumenta la afinidad hacia el fosfoenolpiruvato.*

Se realizaron experimentos con el objetivo de establecer una correlación entre fosforilación y actividad de Pyk1. Se determinó la actividad de la Pyk de preparaciones parcialmente

purificadas a partir de cepas con diferentes niveles de actividad PKA. Si se compara el comportamiento de la Pyk derivada de la cepa en la cual se espera mayor fosforilación (1451), con aquella de menor fosforilación mediada por PKA (*tpk1<sup>w1</sup>*), pueden observarse las siguientes diferencias: desplazamiento de la curva de titulación para PEP hacia la izquierda (Figura 11) junto con un aumento en la cooperatividad, en ausencia de FBP.

Los resultados de fosforilación de la Pyk1 derivada de los extractos de la cepa 1451 por C<sub>b</sub> y defosforilación por el tratamiento con fosfatasa alcalina (Figura 12), indican que las especies derivadas de esta cepa se encontrarían parcialmente fosforiladas, pudiéndose fosforilar por C<sub>b</sub> adicional, y que la fosforilación incrementó la actividad enzimática. Las muestras defosforiladas por el tratamiento con la fosfatasa, presentaron una disminución de la actividad alrededor de 2.5 veces en relación con las preparaciones tratadas con C<sub>b</sub>.

La mutación en el residuo Serina 22, que elimina la fosforilación por PKA, cuando es comparada con la proteína salvaje, presentó menor afinidad por el PEP en ausencia de FBP. Estos resultados indican que la modificación en los parámetros cinéticos, analizados en forma global, sugieren que la Pyk1 fosforilada es más activa. Es interesante notar que, a diferencia de *S. cerevisiae*, la fosforilación de la Pyk de hígado de rata por PKA genera isoformas inactivas de la enzima (El-Maghrabi *et al*, 1982).

La Pyk cataliza el paso final de la glicólisis, produciendo dos moléculas de ATP. La enzima convierte el fosfoenolpiruvato (PEP) y ADP a piruvato y ATP. Esta reacción es un paso que regula la dirección del flujo de la vía: hacia fermentación o hacia fosforilación oxidativa del piruvato. En la mayoría de las células la reacción es irreversible y es uno de los principales puntos de control de la glicólisis. Además, la regulación de la Pyk es importante para el control de los niveles de ATP, GTP e intermediarios glicolíticos dentro de la célula.

La regulación alostérica de la actividad de enzimas del metabolismo primario a través de modificaciones postraduccionales, como la fosforilación de Pyk, permite un control fino de las vías del metabolismo del carbono. Además, mantiene un balance apropiado de los sustratos intracelulares y concentración de los productos de cada paso de reacción; y permite una coordinación entre la actividad enzimática, otras reacciones celulares y vías de señalización.

Conclusiones generales.

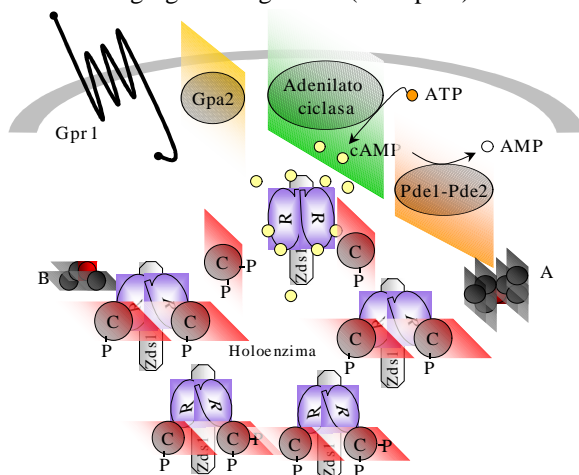
Tanto en *Saccharomyces cerevisiae* como en mamíferos, la PKA como consecuencia de cambios en el medio extracelular participa en diversas reacciones celulares siendo éstas muchas veces interdependientes. Por analogía a la regulación de la PKA de mamíferos, mecanismos adicionales al incremento en los niveles de cAMP intracelular regulan la actividad PKA: incluyendo localización, regulación transcripcional y modificación post-traduccional de sus subunidades.

En *S. cerevisiae*, la PKA regula y orquesta la transición del metabolismo respiratorio al fermentativo en respuesta a cantidades suficientes de azúcares fermentables. La variación en la disponibilidad de la fuente de carbono es transmitida al interior de la célula por el incremento transitorio del nivel de cAMP. Este modelo experimental nos permite, por lo tanto, estudiar el mecanismo de activación y regulación de la actividad PKA *in vivo*.

El empleo de células permeabilizadas resultó un método apropiado para evaluar la actividad de la PKA, que presentó correlación con los fenotipos dependientes de PKA determinados *in vivo* (Capítulo 1 y Capítulo 2).

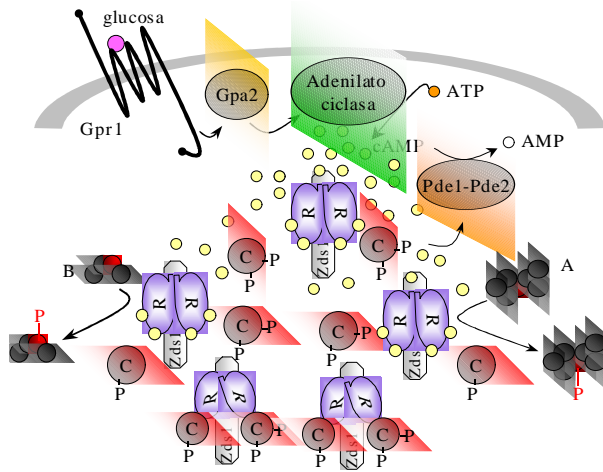
Con el objetivo de integrar los resultados presentados durante el desarrollo de esta tesis, postulamos el siguiente modelo:

Antes del agregado de glucosa (Tiempo 0)



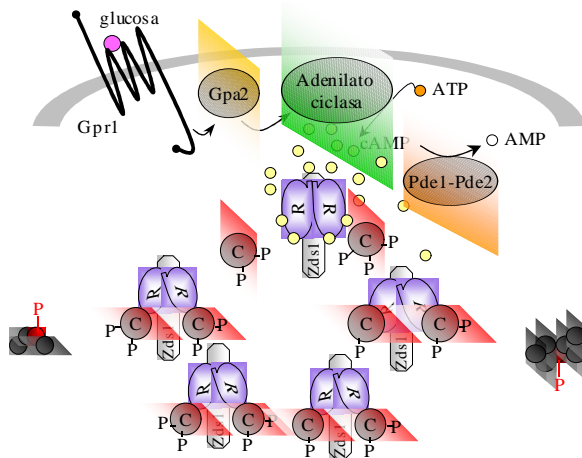
En presencia de glicerol, se presume que la célula presenta actividad PKA baja, que permite el crecimiento en fuente de carbono no fermentable (Thevelein y de Winde, 1999). Las moléculas de holoenzima se localizan en el citoplasma a través de la interacción de la subunidad R con Zds1, lo que provocaría una regulación negativa de la actividad PKA en este compartimento subcelular (Griffioen y Thevelein, 2002). El estado de fosforilación de C es bajo y como consecuencia su eficiencia de catálisis hacia los sustratos es reducida (Capítulo 2). La localización de la holoenzima y el estado de fosforilación de C contribuirían a ajustar el metabolismo del carbono hacia el metabolismo respiratorio, como resultado de la falta de fosforilación de enzimas metabólicas claves (representadas como A y B).

Posterior al agregado de glucosa (Tiempo 2-3 min)



El agregado de glucosa, promueve la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa a través del sistema GPCR (Lemaire *et al*, 2004). La producción de cAMP se presume localizada en dominios, emergiendo desde la membrana plasmática. El incremento de cAMP activa a la PKA y consecuentemente la subunidad C fosforila diversos sustratos (por ejemplo Pyk1 y Pyk2, Capítulo 3) que estarían co-localizados o necesitarían de la difusión de C a otro compartimento subcelular. El sustrato, en presencia de cAMP, contribuye a la disociación de la holoenzima (Vigil *et al*, 2004). Cada sustrato actuaría de manera diferente, dependiendo de la naturaleza estructural y exposición del sitio blanco de fosforilación (Capítulo 3). La activación de la PKA promueve el aumento del estado de fosforilación de C (Capítulo 2).

Posterior al agregado de glucosa (Tiempo 5-10 min)



Como consecuencia del mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por la PKA sobre la señalización vía cAMP, principalmente sobre Pde1, los niveles de cAMP descienden a valores similares previos a la inducción. Esto promueve la reasociación de las subunidades R y C (Capítulo 2). Como consecuencia de la activación de la vía y en presencia de altos niveles de glucosa, se acumulan formas fosforiladas de C, lo cual incrementa la constante de especificidad hacia los sustratos (Capítulo 2). El incremento de la actividad de C permite mantener el metabolismo fermentativo. Luego, el consumo de la glucosa, provoca la acumulación de formas menos activas de C, disminuyendo la actividad PKA para el establecimiento del metabolismo respiratorio (Capítulo 2).

---

Perspectivas.

Del modelo presentado en las conclusiones generales surgen las siguientes preguntas:

*Regulación de la actividad de la PKA por fosforilación de Tpk1 durante la re-configuración del metabolismo respiratorio al fermentativo en S.cerevisiae:*

1) ¿La fosforilación de la subunidad catalítica en respuesta a la disponibilidad de glucosa en el medio extracelular es mediado por la propia PKA a través de un mecanismo de autofosforilación? o es a través de la activación de una quinasa de PKA?

Para abordar este punto se realizará un estudio a nivel proteómico donde se analizará el cambio en el patrón de fosforilación de Tpk1 en una colección de mutantes de delección individuales de 120 proteínas quinasas presentes en el genoma de *S. cerevisiae*.

2) ¿Que residuo/s son fosforilados?

Para la identificación de los residuos fosforilados en Tpk1 durante la transición respiración-fermentación realizaremos MALDI-TOF sobre muestras purificadas de C a partir de la cepa con el epítipo HA o TAP fusionados al gen *TPK1*. A partir de este análisis se podrán construir mutantes del/los residuos blanco de fosforilación por sustitución de éstos a Alanina.

3) ¿Que propiedades cinéticas de Tpk1 afecta la fosforilación?

Se determinará los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_m$  de la Tpk1 salvaje y mutante para el kemptido y el ATP.

4) ¿Es un fenómeno que ocurre en los otros dos alelos, *TPK2* y *TPK3*?

Se evaluará el cambio en el patrón de fosforilación durante la transición del metabolismo respiratorio al fermentativo en cepas que poseen fusionado en el extremo carboxilo terminal los epítipos HA o TAP en los genes *TPK2* o *TPK3* para su detección inmunológica.

5) ¿La fosforilación de Tpk afecta la interacción con Bcy1? ¿Afecta su localización?

Se realizarán experimentos de inhibición de la actividad de cada subunidad C (salvaje fosforilada o mutada) por el agregado de R y la reversión de esta inhibición por concentraciones variables de cAMP. Se estudiará el efecto de la mutación en Tpk1 sobre la localización en diferentes estadios de crecimiento y fuente de carbono.

*Caracterización de nuevos sustratos de PKA en S. cerevisiae: Constantes de especificidad y participación en el mecanismo de activación de la PKA.*

1) ¿Que proteínas son sustrato de PKA?

Se realizará la identificación de nuevos sustratos a partir de la identificación por MALDI de las proteínas que hacen interacción con la holoenzima PKA (ya sea con la subunidad catalítica o con la subunidad regulatoria). Además se identificarán proteínas sustrato por análisis *in silico* y utilización de array de péptidos.

Se determinará las constantes de especificidad de su *in vitro*.

## Bibliografía



Amieux PS, McKnight GS (2002) The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity. *Ann NY Acad Sci.* 968: 75-95.

App H, Holzer H (1989) Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS1 mutant. *J Biol Chem.* 264: 17583-8.

Arguelles JC, Mbonyi K, Van Aelst L, Vanhalewyn M, Jans AW, Thevelein JM (1990) Absence of glucose-induced cAMP signaling in the *Saccharomyces cerevisiae* mutants cat1 and cat3 which are deficient in derepression of glucose-repressible proteins. *Arch Microbiol* 154: 199-205.

Beck T, Hall MN (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature.* 402: 689-92.

Beebe SJ, Oyen O, Sandberg M, Froyso A, Hansson V, Jahnsen T (1990) Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol.* 3: 465-75.

Bell W, Sun W, Hohmann S, Wera S, Reinders A, De Virgilio C, Wiemken A, Thevelein JM (1998) Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J Biol Chem.* 273: 33311-9.

Boles E, Schulte F, Miosga T, Freidel K, Schlüter E, Zimmermann FK, Hollenberg CP, & Heinisch JJ (1997) Characterization of a glucose-repressed pyruvate kinase (Pyk2p) in *Saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to fructose-1,6-bisphosphate. *J Bacteriol.* 179: 2987-2993.

Borges AC, Gomes SL (2000) PEST sequences in cAMP-dependent protein kinase subunits of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* are necessary for *in vitro* degradation by endogenous proteases. *Mol Microbiol* 36: 926-39.

Boy-Marcotte E, Ikonomi P, Jacquet M (1996) SDC25, a dispensable Ras guanine nucleotide exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae* differs from CDC25 by its regulation. *Mol Biol Cell.* 7: 529-39.

Boy-Marcotte E, Perrot M, Bussereau F, Boucherie H, Jacquet M (1998) Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 180: 1044-52.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

- Brazill DT, Thorner J & Martin GS. (1997) Mck1, a member of the glycogen synthase kinase 3 family of protein kinases, is a negative regulator of pyruvate kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179: 4415-4418.
- Brown AM (2001) A step-by-step guide to non-linear regression analysis of experimental data using a Microsoft Excel spreadsheet. *Computer Methods Progr Biomed* 65: 191-200.
- Cantisani Borges, AC, Lopes Gomes S (2000) PEST sequences in cAMP-dependent protein kinase subunits of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* are necessary for *in vitro* degradation by endogenous proteases. *Mol Microbiol* 36: 926-939.
- Cameron S, Levin L, Zoller M, Wigler M (1988) cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *S. cerevisiae*. *Cell* 53: 555-66.
- Cannon JF, Gibbs JB & Tatchell K (1986) Suppressors of the *ras2* mutation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 113: 247-264.
- Cannon JF, Gitan R & Tatchell K (1990) Yeast cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit mutations display a variety of phenotypes. *J Biol Chem* 265: 11897-11904.
- Car DW, Stofoko-Hahn RE, Fraser ID, Cone RD, Scott ID (1992) Localization of the cAMP dependent protein kinase to the postsynaptic densities by A-kinase anchoring proteins. Characterization of AKAP79. *J Biol Chem*. 267: 16816-16823.
- Cauthron RD, Carter KB, Liaw S, Steinberg RA (1998) Physiological phosphorylation of protein kinase A at Thr-197 is by a protein kinase A kinase. *Mol Cell Biol* 18: 1416-1423.
- Cherry JR, Johnson TR, Dollard C, Shuster JR, Denis CL (1989) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates and inactivates the yeast transcriptional activator ADR1. *Cell*. 56: 409-19.
- Chester VE (1968) Heritable glycogen-storage deficiency in yeast and its induction by ultra-violet light. *J Gen Microbiol*. 51: 49-56.
- Colombo S, Ma P, Cauwenberg L, Winderickx J, Crauwels M, Teunissen A, Nauwelaers D, de Winde HJ, Gorwa M-F, Colavizza D and Thevelein JM (1998) Involvement of distinct G-proteins and RAS, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 17: 3326-3341.
- Colombo S, Ronchetti D, Thevelein JM, Winderickx J, Martegani E (2004) Activation state of the Ras2 protein and glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 279: 46715-22.

Cummings DE, Brandon EP, Planas JV, Motamed K, Idzerda RL, McKnight GS. (1996) Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII beta subunit of protein kinase A. *Nature*. 382(6592): 622-6.

Cytryńska M, Frajnt M & Jakubowicz T (2001) *Saccharomyces cerevisiae* pyruvate kinase Pyk1 is PKA phosphorylation substrate *in vitro*. *FEMS Microb Lett*. 203: 223-227.

Danchin A. Phylogeny of adenylyl cyclases (1993) *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*. 27:109-62.

De Winde JH, Crauwels M, Hohmann S, Thevelein JM, Winderickx J (1996) Differential requirement of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *Eur J Biochem*. 241: 633-43.

Denis CL, Kemp BE and Zoller MJ (1991) Substrate specificities for yeast and mammalian cAMP-dependent protein kinases are similar but not identical. *J Biol Chem* 266: 17932-17935.

DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278: 680-6.

Dickinson JR & Schweizer M (1999) The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Ed Taylor & Francis Ltd, London.

Diller TC, Madhusudan, Xuong NH, Taylor SS (2001) Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta regulatory subunit. *Structure (Camb)*. 9(1): 73-82.

Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD, Langeberg LK, Scott JD (2001) mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J*. 20(8): 1921-30.

Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem*. 60: 653-88.

Dombek KM, Camier S, Young ET (1993) ADH2 expression is repressed by REG1 independently of mutations that alter the phosphorylation of the yeast transcription factor ADR1. *Mol Cell Biol*. 13: 4391-9.

Døskeland SO, Maronde E & Gjersten BT (1993) The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase - functionally different or redundant? *Biochim Biophys Acta* 1178: 249-258.

Dostmann WR, Taylor SS. (1991) Identifying the molecular switches that determine whether (Rp)-cAMPS functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase I. *Biochemistry*. 30(35): 8710-6.

Efrat S, Tal M, Lodish HF (1994) The pancreatic beta-cell glucose sensor. *Trends Biochem Sci*. 19: 535-8.

El-Maghrabi MR, Claus TH, McGrane MM & Pilgis SJ (1982) Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 257: 233-240.

Entian KD & Barnett JA (1992) Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem Sci* 17: 506-510.

Fenton AW & Blair JB (2002) Kinetic and allosteric consequences of mutations in the subunit and domain interfaces and the allosteric site of yeast pyruvate kinase. *Arch Biochem Biophys* 397: 28-39.

Field J, Vojtek A, Ballester R, Bolger G, Colicelli J, Ferguson K, Gerst J, Kataoka T, Michaeli T, Powers S, *et al.* (1990a) Cloning and characterization of CAP, the *S. cerevisiae* gene encoding the 70 kd adenylyl cyclase-associated protein. *Cell*. 61: 319-27.

Field J, Xu HP, Michaeli T, Ballester R, Sass P, Wigler M, Colicelli J (1990b) Mutations of the adenylyl cyclase gene that block RAS function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*. 247: 464-7.

Formosa T, Barry J, Alberts BM & Greenblatt J (1991) Using protein affinity chromatography to probe structure of protein machines. *Methods Enzymol* 208: 24-45.

Francis SH & Corbin JD (1994) Structure and function of cyclic nucleotide dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* 56: 237-272.

Gilman AG (1984) G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*. 36:577-9.

Glass DB, Feller MJ, Levin LR, Walsh DA (1992) Structural basis for the low affinities of yeast cAMP-dependent and mammalian cGMP-dependent protein kinases for protein kinase inhibitor peptides. *Biochemistry*. 31:1728-34.

Gonçalves PM & Planta RJ (1998) Starting up yeast glycolysis. *Trends Microbiol*. 6: 314-319.

Gonçalves PM, Griffioen G, Bebelman JP & Planta RJ (1997) Signalling pathways leading to transcriptional regulation of genes involved in the activation of glycolysis in yeast. *Mol Microbiol* 25: 483-493.

Görner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, Schüller C (1998) Nuclear localization of the C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> zinc finger protein Msn2 is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & Dev* 10: 1516-1531.

Görner W, Durchschlag E, Wolf J, Brown EL, Ammerer G, Ruis H, Schuller C (2002) Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J*. 21: 135-44.

Griffioen G, Anghileri P, Imre E, Baroni MD, Ruis H (2000) Nutricional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 275: 1449-1456.

Griffioen G, Branduardi P, Ballarini A, Anghileri P, Norbeck J, Baroni MD, Ruis H Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain (2001) *Mol Cell Biol* 21: 511-523.

Griffioen G, Swinnen S, Thevelein JM. (2003) Feedback inhibition on cell wall integrity signaling by Zds1 involves Gsk3 phosphorylation of a cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit. *J Biol Chem*. 278(26): 23460-71.

Griffioen G, Thevelein JM (2002) Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. *Curr Genet* 41: 199-207.

Gross E, Goldberg D, Levitzki A (1992) Phosphorylation of the *S. cerevisiae* Cdc25 in response to glucose results in its dissociation from Ras. *Nature*. 360: 762-5.

Guthmann M, Pastori R, Moreno S (1990) Polyamines and basic proteins stimulate activation by cAMP and catalytic activity of *Mucor rouxii* cAMP dependent protein kinase. *Cellular Signalling* 2: 395-402.

Gygi SP, Rochon Y, Franza BR & Aebersold R (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19: 1720-1730.

Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R, Montminy MR (1993) Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol*. 13(8): 4852-9.

Hamuro Y, Burns L, Canaves J, Hoffman R, Taylor S, Woods V (2002) Domain organization of D-AKAP2 revealed by enhanced deuterium exchange-mass spectrometry (DXMS). *J Mol Biol*. 321(4):703-14.

Hayes JS, Brunton LL, Mayer SE (1980) Selective activation of particulate cAMP-dependent protein kinase by isoproterenol and prostaglandin E1. *J Biol Chem*. 255: 5113-9.

- Heller WT, Vigil D, Brown S, Blumenthal DK, Taylor SS, Trewella J (2004) C subunits binding to the protein kinase A RI alpha dimer induce a large conformational change. *J Biol Chem.* 18: 19084-90.
- Hemmings BA, Aitken A, Cohen P, Rymond M, Hofmann F (1982) Phosphorylation of the type-II regulatory subunit of cyclic-AMP-dependent protein kinase by glycogen synthase kinase 3 and glycogen synthase kinase 5. *Eur J Biochem.* 127: 473-81.
- Hoffman CS & Winston F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57: 267-272.
- Hofmann F, Bechtel PJ, Krebs EG (1977) Concentrations of cyclic AMP-dependent protein kinase subunits in various tissues. *J Biol Chem.* 252: 1441-7.
- Huang LJ & Taylor SS (1998) Dissecting cAMP binding domain A in the RIalpha subunit of cAMP-dependent protein kinase. Distinct subsites for recognition of cAMP and the catalytic subunit. *J Biol Chem* 273: 26739-26746.
- Humble E, Berglund L, Titanji V, Ljungstrom O, Edlund B, Zetterqvist O, Engstrom L. (1975) Non-dependence on native structure of pig liver pyruvate kinase when used as a substrate for cyclic 3',5'-AMP-stimulated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 66: 614-21.
- Hunter T (1994) 1001 protein kinases redux--towards 2000. *Semin Cell Biol.* 5: 367-76.
- Huse M, Kuriyan J (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.* 109: 275-82.
- Ito H, Fukuda Y, Murata K & Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153: 163-168.  
*J Cell Sci.* 114:3255-64.
- Jacquet M, Renault G, Lallet S, De Mey J, Goldbeter A (2003) Oscillatory behavior of the nuclear localization of the transcription factors Msn2 and Msn4 in response to stress in yeast. *ScientificWorldJournal.* 3: 609-12.
- Jiang Y, Davis C, Broach JR (1998) Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae* requires signalling through the Ras pathway. *EMBO J* 17: 6942-6951.
- Johnson DA, Leathers VL, Martinez AM, Walsh DA, Fletcher WH (1993) Fluorescence resonance energy transfer within a heterochromatic cAMP-dependent protein kinase holoenzyme under equilibrium conditions: new insights into the conformational changes that result in cAMP-dependent activation. *Biochemistry.* 32(25): 6402-10.

- Johnson LN, Noble ME, Owen DJ (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*. 85:149-58.
- Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, Shi W, Nowak T & Stoddard BL (1998) The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure* 6: 195-210.
- Karchin R, Karplus K, Haussler D (2002) Classifying G-protein coupled receptors with support vector machines. *Bioinformatics*. 18: 147-59.
- Kataoka T, Broek D, Wigler M (1985) DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell*. 43: 493-505.
- Kemp BE, Bylund DB, Huang TS, Krebs EG (1975) Substrate specificity of the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 72: 3448-52.
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM (1991) Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*. 253: 414-20.
- Kopperud R, Krakstad C, Selheim F, Doskeland SO (2003) cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett*. 546: 121-6.
- Kraakman L, Lemaire K, Ma P, Teunissen AW, Donaton MC, Van Dijck P, Winderickx J, de Winde JH and Thevelein JM (1999) A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol* 32: 1002-1012.
- Krebs EG, Beavo JA (1979) Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem*. 48: 923-59.
- Kreegipuu A, Blom N, Brunak S, Jarv J (1998) Statistical analysis of protein kinase specificity determinants. *FEBS Lett*. 430: 45-50. Review.
- Kumar A, Agarwal S, Heyman JA, Matson S, Heidtman M, Piccirillo S, Umansky L, Drawid A, Jansen R, Liu Y, Cheung KH, Miller P, Gerstein M, Roeder GS, Snyder M (2002) Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev*. 16: 707-19.
- Kunkel TA, Roberts JD & Zakour RA (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol* 154: 367-382.
- Kuret J, Johnson K, Nicolette C and Zoller MJ (1988) Mutagenesis of the regulatory subunit of yeast cyclic AMP-dependent protein kinase; isolation of site-directed mutants with altered binding affinity for catalytic subunit. *J Biol Chem* 263: 9149-9154.

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 277: 680-682.
- Lafuente MJ, Gancedo C, Jauniaux JC, Gancedo JM (2000) Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 35: 161-72.
- Landsverk HB, Carlson CR, Steen RL, Vossebein L, Herberg FW, Tasken K, Collas P (2001) Regulation of anchoring of the RIIalpha regulatory subunit of PKA to AKAP95 by threonine phosphorylation of RIIalpha: implications for chromosome dynamics at mitosis. *J Cell Sci.* 114: 3255-64.
- Lemaire K, Van de Velde S, Van Dijck P, Thevelein JM (2004) Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell.* 16:293-9.
- Levin L & Zoller MJ (1990) Association of catalytic and regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase requires a negatively charged side group at a conserved threonine. *Mol Cell Biol* 10: 1066-1075.
- Li H, Degenhardt B, Tobin D, Yao ZX, Tasken K, Papadopoulos V (2001) Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: a peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA (RIIalpha)-associated protein. *Mol Endocrinol.* 12: 2211-28.
- Londesborough J & Lukkari TM (1980) The pH and temperature dependence of the activity of the high  $K_m$  cyclic nucleotide phosphodiesterase of baker's yeast. *J Biol Chem* 255: 9262-9267.
- Ma P, Wera S, Van Dijck P, Thevelein JM (1999) The *PDE1* encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signalling. *Mol Cell Biol* 10: 91-104.
- Maggesse MC, Galvagno MA, Cantore ML & Passeron S (1982) *In situ* measurement of cAMP related enzymes in the dimorphic fungus *Mucor rouxii*. *Cell Biol Int Rep* 6: 1101-1108.
- Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J* 15: 2227-2235.
- Martzen MR, McCraith SM, Spinelli SL, Torres FM, Fields S, Grayhack EJ & Phizicky E M (1999) A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science* 286: 1153-1155.



Mashhoon N, Carmel G, Pflugrath JW, Kuret J (2001) Structure of the unliganded cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*. 387(1): 11-9.

Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2(8): 599-609.

Mazón MJ, Behrens MM, Morgado E, Portillo F (1993) Low activity of the yeast cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Tpk3 is due to the poor expression of the *TPK3* gene. *Eur J Biochem* 312: 501-506.

Mbonyi K, Beullens M, Detremere K, Geerts L, Thevelein JM (1988) Requirement of one functional *RAS* gene and inability of an oncogenic ras-variant to mediate the glucose-induced cAMP signal in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8: 3051-3057.

Mbonyi K, van Aelst L, Arguelles JC, Jans AW, Thevelein JM (1990) Glucose-induced hyperaccumulation of cyclic AMP and defective glucose repression in yeast strains with reduced activity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol*. 10: 4518-23.

Mitchell DA, Marshall TK & Deschenes RJ (1993) Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* 9: 715-723.

Moore MJ, Adams JA, Taylor SS (2003) Structural basis for peptide binding in protein kinase A. Role of glutamic acid 203 and tyrosine 204 in the peptide-positioning loop. *J Biol Chem*. 278: 10613-8.

Moore MJ, Kanter JR, Jones KC, Taylor SS (2002) Phosphorylation of the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol Chem* 277: 47878-47884.

Moore PA, Sagliocco FA, Wood RM & Brown AJ (1991) Yeast glycolytic mRNAs are differentially regulated. *Mol Cell Biol* 11: 5330-5337.

Moreno S, Pastori R, Passeron S (1983) Protein kinase of *Mucor rouxi*. Unshielding of new cyclic AMP-binding sites upon dissociation of the ternary complex holoenzyme-cyclic AMP. *Mol Cell Biochem* 52: 13-16.

Moskvina E, Schuller C, Maurer CTC, Magger WH, Ruis H (1998) A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast* 14: 1041-1050.

Navas MA & Gancedo JM (1996) The regulatory characteristics of yeast fructose-1,6-bisphosphatase confer only a small selective advantage. *J Bacteriol* 178: 1809-1812.

- Neves MJ, Jorge JA, Francois JM, Terenzi HF (1991) Effects of heat shock on the level of trehalose and glycogen, and on the induction of thermotolerance in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* 283: 19-22.
- Nikawa J, Cameron S, Toda T, Ferguson KW, Wigler M (1987) Rigorous feedback control of cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 1: 931-937.
- Nwaka S, Mechler B, Destruelle M, Holzer H (1995) Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 360: 286-90.
- Ozcan S, Dover J, Rosenwald AG, Wolf S, Johnston M (1996) Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 12428-32.
- Pan X, Heitman J. (2002) Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol.* 12: 3981-93.
- Parrou JL, Enjalbert B, Plourde L, Bauche A, Gonzales B and Francois J (1999) Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 191-203.
- Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM & Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567.
- Pilkis SJ, Claus TH & El-Maghrabi MR (1988) The role of cyclic AMP in rapid and long-term regulation of gluconeogenesis and glycolysis. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* 22: 175-191.
- Portela P, Howell S, Moreno S, Rossi S (2002) *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by Protein kinase A. *J Biol Chem* 277: 30477-30487.
- Portela P, Van Dijck P, Thevelein JM, Moreno S (2002) Activation state of protein kinase A as measured in permeabilised *Saccharomyces cerevisiae* vells correlates with PKA-controlled phenotypes *in vivo*. *FEMS Yeast Res* 3: 119-126.
- Portela P, Zarembeg V and Moreno S (2001) Evaluation of *in vivo* activation of proteína kinase A under non-dissociable conditions through the overexpression of wild-type and mutant regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* 147: 1149-1159.
- Purwin C, Leidig F, Holzer H (1982) Cyclic AMP-dependent phosphorylation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1482-9.
- Rayner TF, Gray JV & Thorner JW (2002) Direct and novel regulation of cyclic AMP-dependent protein kinase by Mck1p, a yeast GSK-3. *J Biol Chem.* 19: 16814-22.

- Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-71.
- Rich TC, Fagan KA, Nakata H, Schaack J, Cooper DM, Karpen JW (2000) Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *J Gen Physiol*. 116:147-61.
- Robertson LS, Causton HC, Young RA & Fink GR (2000) The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5984-5988.
- Rolland F, Wanke V, Cauwenberg L, Ma P, Boles E, Vanoni M, de Winde JH, Thevelein JM, Winderickx J (2001) The role of hexose transport and phosphorylation in cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 1: 33-45.
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2001) Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 26: 310-317.
- Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2002) Glucose-sensing and –signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* 2: 183-201.
- Roosen J, Tanghe A, Thevelein JM, Winderickx J (2001) Unravelling transcriptional regulation by the cyclic AMP dependent protein kinase (PKA) and the Sch9 protein kinase (PKB) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18 (S1): 10-05.
- Rose MD, Winston F and Hieter P (1990) Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Roskoski R (1983) Assay of protein kinase. *Methods Enzymol* 99: 3-6.
- Rossi S, Guthmann M, Moreno S (1992) Autophosphorylation of *Mucor rouxii* cAMP-dependent protein kinase and its role in holoenzyme activation. *Cell Signal*. 4: 443-51.
- Rost B, Sander C (1994) Conservation and prediction of solvent accessibility in protein families. *Proteins*. 20: 216-26.
- Ruis H & Schüller C (1995) Stress signalling in yeast. *Bioessays* 17: 959-965.
- Saraswat LD, Filutowicz M & Taylor SS (1986) Expression of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 261: 11091-11096.
- Schmelzle T, Beck T, Martin DE, Hall MN (2004) Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol* 24: 338-51.

Schuller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, Ruis H (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J.* 13: 4382-9.

Schwechheimer K & Hofmann F (1977) Properties of regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase (peak I) from rabbit skeletal muscle prepared by urea treatment of the holoenzyme. *J Biol Chem* 252: 7690-7696.

Scott JD, Stofko RE, McDonald JR, Comer JD, Vitalis EA, Mangili JA (1990) Type II regulatory subunit dimerization determines the subcellular localization of the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 265(35): 21561-6.

Scriven DR, Dan P, Moore ED (2000) Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys J.* 79(5): 2682-91.

Shabb JB (2001) Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev.* 101: 2381-411.

Sherman F, Fink G & Hicks JB (1981) Methods in yeast genetics: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor, NY.* Cold Spring Harbor Laboratory.

Shevchenko A, Jensen O, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Boucherie H & Mann M (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14440-14445.

Sigma Chemical Co (1986). Technical Bulletin MKr-137. Sigma Chemical Co- St. Louis, Mo.

Skalhegg BS, Tasken K (2000) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 5: 678-93.

Smeekens S, Rook F (1997) Sugar Sensing and Sugar-Mediated Signal Transduction in Plants. *Plant Physiol.* 115: 7-13.

Smith A, Ward MP, Garrett S (1998) Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* 17(13): 3556-64.

Sorol MR, Pereyra E, Mizyrycki C, Rossi S, Moreno S (2001) Protein kinase A activity in permeabilized cells as an approximation to *in vivo* activity. *Exp Cell Res* 10: 337-43.

- Steinberg RA, Cauthron RD, Symcox MM, Shuntoh H (1993) Autoactivation of catalytic (C alpha) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of threonine 197. *Mol Cell Biol* 13: 2332-2341.
- Tasken K, Aandahl EM (2004) Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 1:137-67.
- Taskén K, Skálhegg BS, Taskén KA, Solberg R, Knutsen HK, Levy FO, Sandberg M, Ørstavik S, Larsen T, Johansen AK, Vang T, Schrader HP, Reinton NT, Torgersen KM, Hansson V & Jahnsen T (1997) Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv Second Messengers Phosphoprotein Res* 31: 191-204.
- Tatchell K (1986) *RAS* genes and growth control in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 166: 364-367.
- Tatchell K (1993) *RAS* genes in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In *Signal Transduction Prokaryotic and Simple Eukaryotic Systems*. In Kurjan, J., and Taylor, B.J. (eds) San Diego: Academic Press, pp. 147-188.
- Thevelein JM & de Winde JH (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33: 904-918.
- Thevelein JM (1991) Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the Ras-adenylate cyclase signalling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol Microbiol* 5: 1301-1307.
- Thevelein JM (1992) The RAS-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Leeuwenhoek* 62: 109-130.
- Thevelein JM (1994) Signal transduction in yeast. *Yeast* 10: 1753-1790.
- Thevelein JM and de Winde JH (1999) Novel sensing mechanism and target for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33: 904-918.
- Thevelein JM, Beullens M, Honshoven F, Hoebeeck G, Detremerie K, Griewel B, den Hollander JA, Jans AWH (1987b) Regulation of the cAMP level in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: intracellular pH and the effect of membrane depolarizing compounds. *J Gen Microbiol* 133: 2197-2205.
- Thevelein JM, Beullens M, Honshoven F, Hoebeeck G, Detremerie K, Den Hollander JA & Jans AWA (1987a). Regulation of the cAMP levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: intracellular pH and the effect of membrane depolarizing compounds. *J Gen Microbiol* 133: 2191-2196.

Thomas BJ & Rothstein RJ (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 4: 619-30.

Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Scott JD, McMullen B, Hurwitz M, Krebs EG, and Wigler M (1987a) Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7: 1371-1377.

Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Wigler M (1987b) Three different genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50: 277-287.

Toda T, Uno I, Ishikawa T, Powers S, Kataoka T, Broek D, Cameron S, Broach J, Matsumoto K, Wigler M (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell* 40: 27-36.

Toner-Webb J, van Patten SM, Walsh DA, Taylor SS (1992) Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 267: 25174-80.

Treitel MA, Carlson M (1995) Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3132-6.

Tung CS, Walsh DA, Trewhella J (2002) A structural model of the catalytic subunit-regulatory subunit dimeric complex of the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 277(14): 12423-31.

Valentini G, Chiarelli L, Fortin R, Speranza ML, Galizzi A & Mattevi A (2000) The allosteric regulation of pyruvate kinase. *J Biol Chem* 275: 18145-18152.

Versele M, de Winde JH, Thevelein JM (1999) A novel regulator of G-protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. *EMBO J* 18: 5577-5591.

Versele M, Lemaire K, Thevelein JM (2001) Sex and sugar in yeast: two distinct GPCR systems. *EMBO Rep* 2: 574-9.

Vigil D, Blumenthal DK, Brown S, Taylor SS, Trewhella J (2004) Differential effects of substrate on type I and type II PKA holoenzyme dissociation. *Biochemistry* 43(19): 5629-36.

Walsh DA, Glass DB & Mitchell RD (1992) Substrate diversity of the cAMP-dependent protein kinase: regulation based upon multiple binding interactions. *Curr Opin Cell Biol* 4: 241-251.

Walsh DA, Van Patten SM (1994) Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J* 8(15): 1227-36.

- Weber IT, Steitz TA, Bubis J, Taylor SS (1987) Predicted structures of cAMP binding domains of type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*. 26(2): 343-51.
- Wen W, Harootunian AT, Adams SR, Feramisco J, Tsien RY, Meinkoth JL, Taylor SS (1994) Heat-stable inhibitors of cAMP-dependent protein kinase carry a nuclear export signal. *J Biol Chem*. 269(51): 32214-20.
- Wera S, De Schrijver E, Geyskens I, Nwaka S, Thevelein JM (1999) Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. 3: 621-6.
- Werner-Washburne M, Braun EL, Crawford ME, Peck VM (1996) Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 19: 1159-1166.
- Wilm M, Shevchenko A, Houthaev T, Breit S, Schweigerer L, Fostsis T & Mann M (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 379: 466-469.
- Winderickx J, de Winde JH, Crauwels M, Hino A, Hohmann S, Van Dijck P, Thevelein JM (1996) Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Mol Gen Genet*. 252: 470-82.
- Yang S, Fletcher WH, Johnson DA (1995) Regulation of cAMP-dependent protein kinase: enzyme activation without dissociation. *Biochemistry*. 34(19): 6267-71.
- Yonemoto W, McGlone ML, Grant B, Taylor SS (1997) Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *Protein Eng* 10: 915-925.
- Zaccolo M & Pozzan T (2002) Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* 295: 1711-5.
- Zähringer H, Thevelein JM and Nwaka S (2000) Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA affect during stress and growth. *Mol Microbiol* 35: 397-406.
- Zähringer H, Holzer H and Nwaka S (1998) Stability of neutral trehalase during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the activity of the catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase, TPK1 and TPK2. *Eur J Biochem* 255: 544-551.
- Zarembeg V & Moreno S (1996) Analysis of the mechanism of activation of cAMP-dependent protein kinase through the study of mutants of yeast regulatory subunit. *Eur J Biochem*. 237: 136-142.

Zarenberg V (1999) Mecanismo de activación de la proteína quinasa A dependiente de cAMP. *Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.*

Zarenberg V, Donella-Deana A and Moreno S (2000) Mechanism of activation of cAMP-dependent protein kinase: In *Mucor rouxii* the Aparent Specific Activity of cAMP-activates holoenzyme is diferent than that of its free catalytic subunit. *Arch. Biochem. Biophysics* 381:74-82.

Zelada A, Castilla R, Passeron S, Giasson L, Cantore ML. (2002) Interactions between regulatory and catalytic subunits of the *Candida albicans* cAMP-dependent protein kinase are modulated by autophosphorylation of the regulatory subunit. *Biochim Biophys Acta*. 1542(1-3): 73-81.

Zhao J, Hoye E, Boylan S, Walsh DA & Trewhella J (1998) Quaternary structures of a catalytic subunit-regulatory subunit dimeric complex and the holoenzyme of the cAMP-dependent protein kinase by neutron contrast variation. *J Biol Chem* 273: 30448-30459.

Zhao J, Hoye E, Boylan S, Walsh DA, Trewhella J (1998) Quaternary structures of a catalytic subunit-regulatory subunit dimeric complex and the holoenzyme of the cAMP-dependent protein kinase by neutron contrast variation. *J Biol Chem*. 273(46): 30448-59.

Zheng J, Knighton DR, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM, Ten Eyck LF (1993) Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Sci*. 2(10): 1559-73.

Zoller M, Kuret J, Cameron S, Levin L, Johnson KE (1988) Purification and chraracterization of C<sub>1</sub>, the catalytic subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase encoded by *TPK1*. *J Biol Chem* 19: 9142-9148.



## Materiales y Métodos

## M&amp;M 1. Cepas de levaduras

| Cepa                | Genotipo  |
|---------------------|---|
| <i>KT1115</i>       | <i>MATa leu2 ura3 his3 pep4Δ</i>  |
| <i>KT1449</i>       | <i>MATa leu2 ura3 his3 pep4Δ bcy1-16</i>  |
| <i>KT1451</i>       | <i>MATα leu2 ura3 his3 pep4Δ bcy1-14</i>  |
| <i>S18 1D</i>       | <i>MATα leu2 ura3 his3 trp1 ade8 tpk1<sup>w1</sup> tpk2::HIS3 tpk3::TRP1</i>            |
| <i>EJ758YOR347C</i> | <i>Mata his3-200 leu2-3 112 ura3-52 pep4::HIS3+ pYEX4T1-GSTYOR347C</i>                  |
| <i>EJ758YAL038W</i> | <i>Mata his3-200 leu2-3 112 ura3-52 pep4::HIS3+ pYEX4T1-GSTYAL038W</i>                  |
| <i>RS13-58-1</i>    | <i>Mata his3 leu2 ura3 trp1 ade8 tpk1<sup>w1</sup> tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 bcy1::LEU2</i> |
| <i>Pyk1-5</i>       | <i>Mata ade1 leu1 ura3 met14 pyk1-5</i>   |
| <i>W303</i>         | <i>Mata leu2 his3 trp1 ade8 can1 ura3</i>   |
| <i>SPI</i>          | <i>Mata leu2 his3 trp1 ade8 can1 GAL SUC<sup>mal</sup></i>                              |
| <i>S7-7 A</i>       | <i>Mata his3 leu2 ura3 trp1 his3 ade8 tpk2::HIS3 tpk3::TRP1</i>                         |
| <i>LK41</i>         | <i>W303 gpr1 (-1+2869)::URA3</i>  |
| <i>TPK1bcy1</i>     | <i>Matα his3 leu2 ura3 trp1 ade8 tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 bcy1::LEU2</i>                   |
| <i>RS13-58 A-1</i>  | <i>Mata his3 leu2 ura3 trp1 ade8 tpk1<sup>w1</sup> tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 bcy1::LEU2</i> |
| <i>35,2,m2/4</i>    | <i>Mata cdc35::Kan pde2::TRP1 msn2::HIS3 msn4::TRP</i>                                  |

Características principales de las cepas.

*KT1115*: Cepa que carece del gen PEP4 que provoca una disminución en la proteólisis general. Cedida por Kelly Tatchell.

*KT1449*: El alelo *bcy1-16* tiene una mutación ocre en la Tyr-345, la cual provoca una delección del sitio B de unión a cAMP (Cannon *et al.*, 1990; Zarembeg & Moreno, 1996). Cedida por Kelly Tatchell.

*KT1451*: El alelo mutante *bcy1-14* posee una delección (desde Gly-285 hasta Leu-298) en la región carboxi-terminal del dominio A de unión a cAMP (Cannon *et al.*, 1990; Zarembeg & Moreno, 1996). Cedida por Kelly Tatchell.

*EJ758-YOR347C* y *EJ758-YAL038W*: Estas cepas se encuentran transformadas con los vectores pYEx4T1, los cuales poseen clonados los respectivos ORF fusionados a glutatión *S*-transferasa (GST) bajo el control del promotor CUP1. Estas cepas fueron compradas a Research Genetics, Inc. (Martzen *et al.*, 1999). Los plásmidos contenidos en estas cepas fueron aislados usando el protocolo para preparación de plásmidos desde células de levaduras descrito por Hoffman *et al.*, 1987. La secuencia de cada ORF fue confirmada usando el primer For: 5'-GAATTCAGCTGACCCAC-3' y el primer Rev: 5'-GATCCCCGGGAATTGCCAT-3'.

*RS13-58-1*: Cepa que sólo posee el gen *TPK1* con una mutación en el aminoácido Leu217 por Ser217. Cedida por J. Thevelein.

*Pyk1-5*: Cepa que posee una mutación puntual en el gen *PYK1* que evita la expresión cromosómica del gen. Cedida por T. Nowak.

*W303* y *SPI*: Cepas salvajes cedidas por J. Thevelein.

*S7-7A*: Cepa que sólo expresa el alelo *TPK1* y el gen *BCY1*. Cedida por J. Thevelein.

*LK41*: Cepa que posee una delección del gen *GPR1*, no se expresa la proteína. Cedida por J. Thevelein.

*TPK1bcy1Δ*: Cepa que sólo expresa el gen *TPK1*. Cedida por J. Thevelein.

*RS13-58A-1*: Cepa que sólo posee el gen *TPK1* con una mutación en el aminoácido Leu217 por Ser217 y no expresa el gen *BCY1*. Cedida por J. Thevelein.

*35,2,m2/4*: Cepa que carece de adenilato ciclasa, como esta delección no es compatible con la vida celular se agregan las delecciones de los genes *MSN2* y *MSN4*. Cepa que sólo posee el gen *TPK1* con una mutación en el aminoácido Leu217 por Ser217. Cedida por J. Thevelein.

#### *M&M2*. Plásmidos

1) *YEp51-BCY1* y *YEp51-bcy1-14*: La construcción de estos plásmidos recombinantes fue realizada por Vanina Zaremborg, ex-becaria de la Dra. Moreno, durante su estadía en el laboratorio de Dr. Kelly Tachell. El fragmento de 2.9 Kb *BamHI-EcoRI* que incluye el gen *BCY1* clonado en pBR322 fue insertado dentro del vector Bluescrip SK(-). Se insertó un sitio de restricción *NcoI* mediante mutagénesis sitio dirigida (Kunkel *et al*, 1987) usando el primer 5'-GTAAGAATAAACCATGGTATCTTCT-3', el cual cambia G por C antes del primer codón de *BCY1*. El fragmento de 1.9 Kb *BspEI-EcoRI* de *bcy1-14* clonado en *Yep24* conteniendo las diferentes mutaciones fue intercambiado por el fragmento *BCY1 (NcoI)* subclonado en el Bluescript SK(-); de esta manera la mutante adquirió el sitio *NcoI* necesario para el subclonado en el vector *YEp51*. Este es un vector de levaduras de 2 $\mu$ , el cual presenta 30-50 copias por célula, y posee un sitio *NcoI* río abajo del promotor de

GAL10, permitiendo la represión transcripcional por la presencia de glucosa y la inducción transcripcional por galactosa como fuente de carbono.

El fragmento de 2.15 Kb *Ncd-HindIII* de SK-*BCY1(Ncd)* y el fragmento de 2.10 Kb SK-*bcy1-14(Ncd)* fueron insertados dentro del Yep51 digerido con las mismas enzimas, resultando el gen *BCY1* y sus alelos mutados bajo el control del promotor *GAL10*

2) p425GPD-*BCY1* y p425GPD-*bcy1-14*: El fragmento de 2.15 Kbp *Ncd-HindIII* que incluye el alelo salvaje (*BCY1*) o el mutado (*bcy1-14*) clonado dentro del YEp51 fueron insertados dentro del vector p425GPD, generando ambos alelos bajo el control del promotor de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. El sitio de restricción para la enzima *Ncd* fue reemplazado por el sitio *BamHI* usando el primer 5'-CTAGGATCCATCGTATCTTC-3'.

3) Ycp50-*HATPK1*: Este plásmido contiene la proteína de fusión HA-Tpk1, cuya expresión se encuentra bajo el control del promotor de *TPK1*, este plásmido fue provisto por Dr. Stephen Garrett, Department of Microbiology and Molecular Genetics, New Jersey Medical School.

4) pYEx4T1- *GSTYOR347C*: Contiene el ORF: YOR347C que codifica para la enzima Pyk2, fusionado a la proteína GST, bajo el control del promotor inducible por cobre, P<sub>cup1</sub> (Martzen *et al*, 1999).

5) pYEx4T1-*GSTYAL038W*: Contiene el ORF: YAL038W que codifica para la enzima Pyk1, fusionado a la proteína GST, bajo el control del promotor inducible por cobre, P<sub>cup1</sub> (Martzen *et al*, 1999).

6) pEG(KG): Contiene el gen GST clonado río abajo del promotor inducible por galactosa *CYC1* (Mitchell *et al.*, 1993)

7) YEp*NTH1-LacZ*: Contiene el promotor (-850 +23) del gen *NTH1*, que codifica para la enzima trehalasa neutra. Este promotor contiene tres elementos STRE (CCCCT). La expresión de la enzima codificada por el gen *LacZ*, β-galactosidasa se encuentra bajo control de dicho promotor (Zähringer *et al*, 2000).

8) pPYK101: Este plásmido contiene el gen de la enzima piruvato quinasa 1 (*PYK1*) bajo el control de su propio promotor. Este plásmido fue generosamente cedido por el Dr. Thomas Nowak, del Department of Chemistry and Biochemistry, University of Notre Dame.

9) pPYK101-PykS22A: Este plásmido contiene la mutante PykS22A, donde el residuo Serina 22 fue reemplazado por Alanina. La mutagénesis sitio dirigida fue realizada mediante el método basado en PCR, en el cual se utilizaron primers complementarios mutantes y como templado el plásmido pPYK101. La mutagénesis fue verificada por secuenciación. Esta construcción fue realizada por la empresa BioMeans, Inc.; Missouri city.

10) pPYK101-PykT94A: Este plásmido contiene la mutante PykT94S, donde el residuo Treonina 94 fue reemplazado por Alanina. La mutagénesis sitio dirigida fue realizada mediante el método basado en PCR, en el cual se utilizaron primers complementarios mutantes y como templado el plásmido pPYK101. La mutagénesis fue verificada por secuenciación. Esta construcción fue realizada por la empresa BioMeans, Inc.; Missouri city.

*M&M 3.* Transformación de levaduras. Las células fueron transformadas por el método de acetato de litio (Ito *et al.*, 1983)

*M&M 4.* Sobreexpresión de las subunidades regulatorias. La cepa de levadura conteniendo el alelo mutante, *bcy1-14* del gen *BCY1* fue transformada por el método descrito en *M&M3*. Las transformantes *LEU 2<sup>+</sup>* fueron seleccionadas en medio selectivo SCGlu-Leu. La sobreexpresión fue verificada antes de cada experimento a través de un ensayo de actividad de unión a cAMP como se describe en *M&M11*.

*M&M 5.* Medios y condiciones de crecimiento. El medio de levaduras fue preparado como describe Sherman *et al.* (1981). Las cepas fueron crecidas sobre medio rico: 2% de Bactopeptona, 1% de extracto de levaduras y 2% de galactosa (YPgal), 2% de glucosa (YPglu), 2% de acetato de potasio (YPAc) o 2% de glicerol (Ypgli). El medio sintético contiene 0.67% de base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos, 2% de glucosa (SCglu) o 2% de galactosa (Scgal) más los aminoácidos necesarios para completar los requerimientos auxotróficos y mantener la selección de los plásmidos. El medio sólido contiene 2% de agar.

Las células fueron crecidas en agitador orbital a 30° C en el medio apropiado y las muestras fueron tomadas a diferentes fases de crecimiento o tiempos luego de un tratamiento de acuerdo a los requerimientos experimentales.

*M&M 6.* Estrés térmico. El tratamiento fue realizado con células creciendo en fase estacionaria (OD<sub>600 nm</sub>: 1-1.2). La muestra fue dividida en alícuotas y rápidamente desplazada desde 30° C a 40° C; después de 40 min a 40° C las células fueron nuevamente incubadas a 30° C por 30 min. El contenido de trehalosa fue determinado sobre estas muestras como se describe en *M&M9*. La supervivencia después del estrés térmico se determinó mediante el plaqueo en spots de diluciones seriadas de suspensiones celulares sobre placas selectivas agarizadas. El estrés térmico no afectó la viabilidad celular.

*M&M 7.* Ensayo de viabilidad durante diferentes fases del crecimiento. El porcentaje de células viables fue determinado por la eficiencia de formar colonias sobre el medio agarizado apropiado según corresponda.

*M&M 8.* Análisis fenotípico sobre medio sólido. La acumulación de glucógeno fue evaluada mediante el color marrón obtenido por las células luego de la tinción con yodo, éste se realiza por inversión de la placa conteniendo los parches de células en un tanque de cromatografía previamente saturado con vapores de I<sub>2</sub> (Chester, 1968).

*M&M 9.* Determinación del contenido de trehalosa, glucógeno y actividad β-galactosidasa. Las células fueron cosechadas por filtración, lavadas una vez con agua fría, pesadas y congeladas en nitrógeno líquido. Las determinaciones de trehalosa y glucógeno fueron realizadas de acuerdo al protocolo descrito por Colombo *et al.*, 1998. Las concentraciones fueron expresadas como mg de trehalosa o glucógeno por 100 mg de peso húmedo de células. La actividad β-galactosidasa utilizando o-nitrofenil-β-D-galactosa (ONPG) como sustrato fue realizada según el protocolo descrito por Rose *et al.*, 1990. La actividad enzimática fue expresada como μmol de ONPG hidrolizado.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> proteínas.

*M&M 10.* Preparación de extracto crudo y purificación parcial de la PKA. Las células de levaduras fueron crecidas hasta una concentración  $0.5-1.0 \times 10^7$  células/ml (fase exponencial de crecimiento) en medio apropiado. Las células fueron lisadas por ruptura con bolitas de vidrio a  $4^\circ \text{C}$  en 0.5 ml de Tris-HCl 50mM pH:7, EDTA 5mM, EGTA 3mM, 2-mercapto-etanol 10mM,  $\beta$ -glicerolfosfato 5mM, coctel de inhibidores de proteasa libre de EDTA. El patrón de isoformas de Tpk1 no cambió significativamente con el empleo del buffer de ruptura suplementado o no con fluoruro de sodio 10mM; ortovanadato de sodio 0.1mM, molibdato de amonio 0.1mM, pirofosfato de sodio 10mM.

El debris celular fue decantado por centrifugación por 5 min,  $5000 \times g$  a  $4^\circ \text{C}$ ; y el sobrenadante fue usado inmediatamente para los ensayos enzimáticos en extractos crudos o para la subsecuente purificación parcial.

La PKA fue parcialmente purificada por precipitación de los extractos crudos con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60% final. Los pellet se almacenaron a  $-20^\circ \text{C}$  y desalados por medio de filtración en Sephadex G-25 inmediatamente antes de usar.

*M&M 11.* Determinación de concentración de proteínas. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método de Bradford con BSA como proteína estándar.

*M&M 12.* Protocolo de permeabilización. Fue realizado de acuerdo a Maggesi *et al.* (1982). Las células ( $1-2 \times 10^8$ ) fueron suspendidas en 1 ml de Tris/HCl 40 mM pH:7, EDTA 0.5 mM,  $\beta$ -glicerolfosfato 5mM, coctel de inhibidores de proteasa libre de EDTA, luego mezcladas con 0.15 ml de tolueno/etanol (1:4, v/v) y agitadas vigorosamente por 5 min a  $4^\circ \text{C}$ . Las células fueron decantadas inmediatamente, lavadas una vez y resuspendidas en el mismo buffer. Las células permeabilizadas fueron usadas dentro de los 30 min posteriores a su preparación.

*M&M 13.* Determinación de las actividades de la subunidades de la PKA.

Subunidad regulatoria: La determinación de la actividad de las subunidad R se realizó sobre la base de su capacidad de unión a  $[^3\text{H}]\text{cAMP}$ . El ensayo se realiza en presencia de

NaCl, el cual promueve la disociación completa de la holoenzima. Alícuotas de muestras parcialmente purificadas o de extractos crudos (la masa empleada es aclarada en cada figura) fueron incubadas por 30 min a 30°C con 0.3  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]cAMP (5000 d.p.m  $\text{pmol}^{-1}$ ; DuPont New England Nuclear), NaCl 0.5 M, en buffer A. Las muestras fueron filtradas a través de nitrocelulosa (MSI), como fue descrito por Moreno *et al.* (1983). El ensayo de unión a cAMP resultó lineal con la concentración de proteínas.

Subunidad catalítica: La actividad catalítica de la subunidad C se determinó usando kemptido (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly) como sustrato. El ensayo se inició mezclando las muestras (diferentes cantidades de proteínas de extractos crudos o el sustrato indicado en cada figura) con diferentes cantidades de PKA (proveniente de diferentes fuentes: subunidad catalítica de corazón bovino (Cb, Sigma), HA-Tpk1 semi-purificada, complejo HA-Tpk1· Bcy1, etc) en 50 mM fosfato de potasio pH: 7.5, 0.1 mM [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP (1000 d.p.m. $\text{pmol}^{-1}$  DuPont New England Nuclear), EGTA 0.1mM, EDTA 0.1mM,  $\text{MgCl}_2$  15mM, 2-mercaptoetanol 10 mM y cAMP 10  $\mu\text{M}$  (cuando se indica). El volumen final de la reacción fue 70  $\mu\text{l}$ . Luego de 10 min a 30° C, las alícuotas fueron procesadas de acuerdo al método de fosfocelulosa (P81; Whatman) descrito por Roskoski (1983). Los ensayos de PKA fueron lineales con el tiempo y la concentración de proteínas. Cb fue reconstituida en ditiotretitol 50 mM y las unidades usadas en los ensayos (expresadas como picomoles de fosfato incorporado a sustrato peptídico sintético por minuto) fueron estimadas de acuerdo a las instrucciones indicadas por el fabricante, excepto cuando es indicado, donde la actividad es determinada bajo las condiciones estándares de ensayo.

*M&M 14.* Actividad PKA *in situ*. Las células ( $1-2 \cdot 10^8$  células) son cosechadas y mezcladas inmediatamente con agua fría. Luego son centrifugadas a  $3000 \times g$  durante 5 min a 4°C. El pellet celular es lavado una vez con agua fría y resuspendido en el buffer A. La permeabilización de las células se realizó como se describe en *M&M12*.

El ensayo de PKA en células permeabilizadas fue realizado por incubación de las muestras con  $1.2-2.4 \times 10^6$  células en un volumen final de 70  $\mu\text{l}$  por 3 min a 30° C en la mezcla de incubación descrita anteriormente (*M&M13*, subunidad catalítica). La reacción es



finalizada por el agregado de BSA 5 mg/ml y el calentamiento a 100° C durante 1 min. Los ensayos fueron lineales con el tiempo y el número de células.

La actividad de PKA es expresada en unidades (U), donde 1 U es la cantidad de enzima que cataliza la transferencia de 1 pmol.min<sup>-1</sup> de fosfato bajo condiciones estándares de ensayo. Los datos obtenidos desde las mediciones de la actividad de PKA *in situ* son expresados en U x 1.10<sup>6</sup> células; este valor esta corregido teniendo en cuenta la viabilidad de las células antes de la permeabilización. Esta corrección es particularmente importante en el caso de las cepas 14bcy y 14 (que poseen menor viabilidad que la cepa salvaje), el medio de cultivo y la fase de crecimiento.

*M&M 15.* Determinación de los niveles de cAMP. Muestras de 0.1-1.0 g de células (peso húmedo) fueron usados para la determinación de cAMP, como fue descripto previamente por Thevelein *et al.*, (1987a). Se utilizó un método para ensayar el cAMP basado en la competencia del cAMP con [<sup>3</sup>H]cAMP por la subunidad R de la PKA de corazón bovino.

*M&M 16.* PAGE nativo: Los geles fueron preparados básicamente como se realizaron los SDS-PAGE pero se omitió el SDS, además el gel concentrador se preparó con Tris-HCl 0.15 M pH:9. La masa molecular de las isoformas de Tpk1p y el dímero (Bcy1p)<sub>2</sub> fueron determinados como se describe en Sigma Chemicals Co, boletín técnico MKr-137. Las isoformas fueron visualizadas por análisis inmunológico (*M&M18*). Este método consta de la realización de varios geles nativos con diferentes %T en los cuales se incluyeron proteínas estándares: Inhibidor de tripsina, anhidrasa carbónica y BSA.

*M&M17.* SDS-PAGE: Muestras de preparaciones proteicas fueron separadas por SDS-PAGE 10%T (Laemmli, 1970).

*M&M18.* Análisis Inmunológico. Muestras de preparaciones proteicas (indicado en cada figura) fueron separadas por SDS-PAGE o geles nativos, transferidas a membranas de nitrocelulosa (MSI) usando Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20% (v/v), durante 90 min a 90 volts. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada, 0.05% de

Tween 20 en buffer PBS, incubada con los siguientes anticuerpos: anti-BCY (BCY1yN-19, Santa Cruz Biotechnology) 1/500; anti-GST (GST Z-5, Santa Cruz Biotechnology) 1/500; anti-piruvato quinasa (anticuerpo policlonal anti-Pyk de músculo de conejo, Rockland), 1/1000; anti-TPK1 (TPK1yC-20, Santa Cruz Biotechnology) 1/500; anti-P-CREB(S133, Santa Cruz Biotechnology) 1/500; anti-Msn2 (generosamente cedido por el Dr F. Estruch, Universidad de Valencia, España) 1/1000; durante 16 h a 4° C. Las membranas fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo anti-cabra, anti-conejo o anti ratón conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) por 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, las membranas fueron lavadas dos veces con solución de bloqueo y dos veces con 0.05% de Tween 20 en TBS. Las membranas fueron incubadas con el reactivo quimioluminiscente Luminol (Santa Cruz Biotechnology) y las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas por autorradiografía y/o analizadas por imagen digital (Bio-Imaging Analyzer Bas-1800II and Image Gauge 3.12 Fujifilm).

*M&M19.* Tratamiento con fosfatasa alcalina de la subunidad catalítica de *S. cerevisiae*. Se utilizó fosfatasa alcalina para defosforilar la proteína Tpk1p presente en extracto crudo de las cepas *SPIWT*, *TPK1BCY1*, *tpk1<sup>w1</sup>* y *TPK1bcy1Δ*. Con el objetivo de analizar las isoformas de Tpk1p tratadas o no con fosfatasa utilizando PAGE nativo, 80 μg de proteína total fueron incubadas por 15 min. a 37° C en un volumen final de 40 μl conteniendo Tris-HCl 0.1 M, pH.9.5, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, NaCl 0.1 M, y 100 unidades de fosfatasa alcalina. La reacción fue detenida por el agregado de un cóctel de inhibidores de fosfatasa. Las muestras tratadas o no previamente con fosfatasa alcalina fueron separadas en PAGE nativo, y las isoformas de Tpk1p fueron analizadas inmunológicamente utilizando el anti-TPK1.

*M&M20.* Determinación de los parámetros cinéticos de las isoformas de Tpk1p: Los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  de las isoformas de Tpk1p fueron determinados utilizando muestras con diferentes grados de fosforilación, tratadas o no previamente con fosfatasa alcalina. Extracto crudo de la cepa *TPK1bcy1Δ* o *TPK1BCY1* cosechadas pre o post agregado de glucosa fueron incubado con Tris-HCl 0.1 M, pH.9.5, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, NaCl

0.1 M, y 100 unidades de fosfatasa alcalina-biotinamidocaproil. La reacción se detuvo por la adición de 150  $\mu$ l de estreptoavidina inmovilizada sobre óxido de hierro. El complejo fosfatasa alcalina-biotinamidocaproil-estreptoavidina óxido de hierro fue incubado por 30 min a temperatura ambiente y luego separados magnéticamente por 15 min. El sobrenadante fue usado como fuente de enzima Tpk1p defosforilada para medir su actividad.

*M&M21.* Inmunoprecipitación de la holoenzima de *S. cerevisiae*: La cepa *1115+HA-TPKI+Yep51-BCY1* fue crecida en medio Ypgal durante 16 h a 30° C. Las células fueron lisadas por ruptura con bolitas de vidrio a 4° C en fosfato de potasio 0.1 M, pH:7; EDTA 1mM, EGTA 0.1 mM, Glicerol 5%, PMSF 0.1 mM, antipaína 3  $\mu$ g/ml y Tritón X-100 0.5 %. El debris celular fue precipitado por centrifugación a 5000 xg por 5 min, y el extracto crudo fue utilizado para la inmunoprecipitación del complejo HA-Tpk1- Bcy1. Una alícuota de 0.5 ml de extracto crudo (2.5 mg/ml) fue incubada con anticuerpo anti-HA (4 mg/ml) o con un anticuerpo no específico durante 1 h a 4° C, luego se le agregó proteína A/G agarosa (30  $\mu$ l), y se incubó durante 16 h a 4° C. El inmunoprecipitado fue lavado con 5 ml de buffer descrito arriba más 0.1 M NaCl. La fosforilación del inmunoprecipitado fue realizada por incubación con 0.1 mM [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP (700 d.p.m. pmol<sup>-1</sup>) mas 10  $\mu$ M cAMP cuando se indica. Los inmunoprecipitados fueron sujetos a SDS-PAGE. El gel fue teñido con Coomasie blue coloidal, desteñido, y autorradiografiado. La actividad proteína quinasa de cada inmunoprecipitado fue ensayada bajo condiciones estándares de ensayo (*M&M13*).

*M&M22.* Inducción de los GST-ORF y purificación de las proteínas de fusión. Parches de las cepas *EJ758-YOR347C* y *EJ758-YAL038W* fueron inoculados en medio líquido SC-Ura, crecidas toda la noche, e inoculadas nuevamente en SC-Ura-Leu, crecidas hasta OD<sub>600</sub>= 0.8, e inducidas con Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 mM por 2h antes de cosecharlas. Las células fueron rotas con bolitas de vidrio en Tris-HCl 50 mM, pH: 7.5; EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, ditiotretitol 5 mM, glicerol 10 %, y NaCl 0.5 M mas leupepetina 2  $\mu$ g/ml, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, y antipaína 3  $\mu$ g/ml. La proteína GST fue purificada desde el extracto

crudo de cultivos 1115+*GST* inducidos por el agregado de 2% de galactosa (Mitchell *et al.*, 1993). La proteína GST y las proteínas de fusión GST-Pyk1 y GST-Pyk2 fueron purificadas por cromatografía glutation-agarosa en el buffer indicado anteriormente, pero en presencia de NaCl 1 M. Las proteínas fueron eluidas por incubación a 37° C con glutation 40 mM, ditioneitol 20 mM. Luego de dializar las muestras en Tris-HCl 20 mM, pH:7.4, EDTA 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, ditioneitol 1 mM, NaCl 55 mM, glicerol 50 %, las preparaciones fueron almacenadas en alícuotas a -20° C. La eficiencia de elución de GST-Pyk1 y GST-Pyk2 fue baja; por lo tanto algunos experimentos fueron realizados con las proteínas de fusión unidas a agarosa-glutation. La concentración de la enzima inmovilizada fue estimada por SDS-PAGE, utilizando BSA como proteína estándar.

*M&M23*: Expresión y semipurificación de las proteínas Pyk, PykS22A y PykT94A. La piruvato quinasa salvaje y mutantes fueron purificadas a partir de la cepa *pyk1-5* transformada con el vector pPYK101, pPYK101-PykS22A o pPYK101-PykT94S. La semipurificación incluyó un primer paso de cromatografía de intercambio aniónico utilizando DEAE-celulosa, luego cromatografía de intercambio catiónico empleando Fosfocelulosa y una precipitación con 60% de sulfato de amonio. Los pellets son almacenados a -20° C. Previo al uso, éstos fueron desalados por cromatografía en gel Sephadex G-25.

*M&M24*. Fosforilación *in vitro* de las proteínas GST-Pyk1, GST-Pyk2, Pyk, PykS22A y PykT94A. La semi-purificación de HA-Tpk1 fue realizada por inmunoprecipitación a partir de extracto crudo de la cepa 1115+*HA-TPK1* crecida por 16 h a 30° C en SC-Ura. La inmunoprecipitación fue realizada usando anti-HA (4 mg/ml) o un anticuerpo no específico (suero preinmune de conejo) como se describe en *M&M18*. Los inmunoprecipitados fueron lavados primero con fosfato de potasio 0.1 M, pH:7; EDTA 1mM, EGTA 0.1 mM, Glicerol 5%, PMSF 0.1 mM, antipaína 3 µg/ml y Tritón X-100 0.5 % mas NaCl 1M, seguido por un lavado con el mismo buffer pero se omitió el NaCl. La actividad quinasa de HA-Tpk1 inmunoprecipitada fue determinada bajo condiciones estándares de ensayo (*M&M13*). La preparación de HA-Tpk1 obtenida, presentó una relación  $-/+$  cAMP 0.9 y un valor  $K_{mi}$ : 50

$\mu\text{M}$  para el kemptido (Aquí definimos 1U: cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 pmol de fosfato por minuto) . Los ensayos de fosforilación *in vitro* fueron realizados en volumen final de 40  $\mu\text{l}$  utilizando HA-Tpk1 parcialmente purificada (como se describe anteriormente) o Cb (Sigma) como fuente de PKA. El ensayo fue iniciado por mezclar los sustratos GST-Pyk1 y GST-Pky2 (las cantidades son indicadas en cada caso) con 0.1 mM  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (1000-1300 d.p.m.  $\text{pmol}^{-1}$ ) en Tris-HCl 50mM pH:7, EDTA 5mM, EGTA 3mM, 2-mercapto-etanol 10mM,  $\beta$ -glicerolfosfato 5mM, coctel de inhibidores de proteasa libre de EDTA, en presencia (cuando se indica) de 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del péptido 6-22, derivado de PKI. Las reacciones fueron incubadas 15 min a 30° C. La incorporación de fosfato dentro GST-Pyk1 y GST-Pky2 se determinó en las bandas cortadas de un gel SDS-PAGE seco en un contador de centelleo. Alternativamente, los geles SDS-PAGE secos fueron expuestos para autorradiografía o sujetos a análisis digital de imagen (Bio-Imaging Analyzer Bas-1800II and Image Gauge 3.12 Fujifilm).

Extractos crudos de levaduras derivados de las cepas 1115, *tpk1<sup>w1</sup>* o *Tpk1bcy1 $\Delta$*  crecidas en medio Ypglu durante 16 h a 30° C, fueron usados como fuente de actividad PKA. El extracto crudo fue preparado como se describe en *M&M 10*. Muestras de extractos crudos (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) fueron mezcladas con muestras semipurificadas de GST-Pyk1 y GST-Pky2 (10-20  $\mu\text{g}$ ) en Tris-HCl 50mM pH:7, EDTA 5mM, EGTA 3mM, 2-mercapto-etanol 10mM,  $\beta$ -glicerolfosfato 5mM, coctel de inhibidores de proteasa libre de EDTA más 0.1 mM  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (2200 d.p.m.  $\text{pmol}^{-1}$ ) y cAMP 10  $\mu\text{M}$  cuando fue agregado, en un vol final 40  $\mu\text{l}$ . Después de 30 min a 30° C, las alícuotas fueron sujetas a SDS-PAGE y autorradiografiadas. La cantidad total de actividad catalítica en las preparaciones de extracto crudo fue determinada bajo condiciones de ensayo estándares.

*M&M 25*. Fosforilación *in vivo* de GST-Pyk1 y GST-Pyk2. Las cepas EJ758+*GST-PYK2*, EJ758+*GST-PYK1*, *tpk<sup>w1</sup>*+*GST-PYK2* y *Tpk1<sup>w1</sup>*+*GST-PYK1* fueron crecidas en ScGlu-Ura durante 16 h a 30° C. Los cultivos (20 ml) fueron centrifugados, y los pellets celulares fueron lavados con medio Ypglu libre de fosfatos, suspendidos en el mismo medio (30 ml), crecidos hasta fase exponencial ( $\text{OD}_{600}$ : 0.8), concentrados a 3 ml, e

incubados con 0.5 mCi de [<sup>32</sup>P] ortofosfato. Después de 2 h se realizó la inducción de la proteína de fusión como se describió en *M&M 18*. Las células fueron lavadas con buffer salino frío y rotas con bolitas de vidrio en Tris-HCl 50 mM, pH:7.5, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, ditionitrol 5 mM, glicerol 10 %, NaCl 0.5 M más 2 µg/ml leupepetina, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, y antipaína 3 µg/ml, NaF 10 mM, β-glicerolfosfato 5 mM, y ortovanadato de sodio 1 mM. Se determinó la incorporación de <sup>32</sup>P, la cual resultó similar para la cepa salvaje y *tpk1<sup>w1</sup>*. Las proteínas de fusión GST-Pyk1 y GST-Pyk2 fueron purificadas por cromatografía glutation-agarosa y sujetas a SDS-PAGE. El gel fue secado y analizado por análisis digital de imágenes.

*M&M 26.* Determinación de la actividad piruvato quinasa. La actividad piruvato quinasa fue determinada en buffer imidazol 50 mM, pH:7, conteniendo MgCl<sub>2</sub> 62 mM, y KCl 100 mM. Bajo condiciones estándares se utilizaron, ADP 1.5 mM, FBP 1.5 mM como activador, y diferentes cantidades de PEP. La reacción fue acoplada a la oxidación del NADH por el agregado de 1 unidad de lactato deshidrogenasa por ml y NADH 0.22 mM. El curso de la reacción en el tiempo fue realizado a temperatura ambiente por medición de la disminución de la absorbancia a 340 nm. La actividad de piruvato quinasa es expresada en unidades enzimáticas. 1 unidad enzimática causa la transfosforilación de 1 µmol de fosfato desde el PEP al ADP por minuto a 37° C, bajo condiciones estándares de ensayo.

La  $V_{max}$  representada en la Figura 14, Capítulo 3 fue calculada normalizando los valores de la velocidad expresada en unidades por miligramo de proteína total en la preparación (U Pyk/mg de proteína) con los valores de la abundancia relativa de la Pyk en cada cepa. Este parámetro fue calculado realizando el cociente entre la banda inmunoreactiva de la Pyk obtenida por western blot y la cantidad de proteína visualizada por tinción con Coomassie blue (ambos cuantificados por análisis digital de imágenes).

*M&M 27.* Tratamiento con Fosfatasa Alcalina a la Pyk1 endógena. La fosfatasa alcalina fue utilizada para defosforilar la piruvato quinasa endógena (Pyk1) presente en extracto crudo de la cepa *1451*. La reacción de defosforilación fue realizada por 30 min a 37° C en un vol total de 80 µl. 300 µg de preparaciones crudas, obtenidas a través de la

precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  60 % y desaladas como es descrito anteriormente, fueron incubadas con Tris-HCl 0.1 M, pH.9.5,  $\text{MgCl}_2$  50 mM, NaCl 0.1 M, y 100 unidades de fosfatasa alcalina-biotinamidocaproil. La reacción fue terminada por la adición de 150  $\mu\text{l}$  de estreptoavidina inmovilizada sobre óxido de hierro. El complejo fosfatasa alcalina-biotinamidocaproil-estreptoavidina óxido de hierro fue incubado por 30 min a temperatura ambiente y luego separadas magnéticamente por 15 min. El sobrenadante fue usado como fuente de enzima piruvato quinasa defosforilada para medir su actividad.

*M&M28.* Análisis cinético de los datos.

La estimación de las constantes cinéticas  $V_{max}$  y  $K_m$  fue realizada empleando la ecuación de Michaelis-Menten.

Bajo las condiciones experimentales donde la concentración de sustrato no permite alcanzar experimentalmente la  $V_{max}$ , la ecuación de Michaelis-Menten es transformada a  $v=V_{max}/K_m[S]$ , donde S es la concentración de sustrato. La tangente de la curva en el origen rinde el valor de la constante de especificidad  $V_{max}/K_m$ , el cual es un parámetro crítico para la determinar la especificidad de una enzima por un sustrato.

El análisis cinético de la actividad de la piruvato quinasa fue realizado usando la ecuación de Hill.

*M&M29.* Análisis estadístico de los datos.

Todos los experimentos han sido repetidos varias veces (indicado en cada figura) con cultivos o preparaciones enzimáticas independientes. La actividad PKA *in vivo*+cAMP y el análisis densitométrico de la abundancia relativa de ambas isoformas de Tpk1p se analizaron utilizando prueba T, para muestras dependientes. El efecto del estado de fosforilación de Tpk1p sobre la eficiencia catalítica se analizaron utilizando ANOVA-Tukey HSD test.

*M&M30.* Péptidos utilizados.

El método para determinar la fosforilación del péptidos es intercambio catiónico. La interacción con el papel de fosfocelulosa (cargado negativamente) requiere que el péptido

luego de ser fosforilado tenga al menos una carga neta positiva a pH ácido por lo que, en algunos casos, es necesario el agregado de residuos básicos.

En rojo se indica el aminoácido fosfoceptor y subrayado se indica el residuo agregado (que no pertenece a la secuencia primaria de la proteína) Kemptido: LRRASLG ; S22: LRRTSIIGTR; T94: IRTGTTNDR; T478: LKKGDTYVSI.

#### *M&M31. MALDI.*

Las bandas proteicas elegidas fueron cortadas, lavadas, reducidas y S-alquiladas como se describe en Wilm *et al*, 1996. Luego se les agregó suficiente volumen para cubrir la muestra con tripsina 2ng/μl en NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 5 mM y la digestión se realizó a 32 °C durante 16 hs. Los digeridos fueron acidificados por el agregado de 1/10 vol de ácido trifluoroacético previo al MALDI. El análisis por MALDI fue realizado por el Dr. Steven Howell, del laboratorio de Protein Structure, National Institute for Medical Research, London, United Kingdom.



---

2) ¿Existen dentro de la secuencia de péptidos sustratos para PKA residuos que contribuyan a la activación de la holoenzima?

Del conjunto de todos los péptidos sustratos para PKA se establecerá una secuencia consenso que favorezca la disociación de la holoenzima en presencia de cAMP.

3) ¿La naturaleza estructural y exposición del sitio consenso para la fosforilación afecta a su especificidad como sustrato?

Una vez determinadas las proteínas sustrato, sus secuencias consenso y el grado de participación que tienen en la activación de la holoenzima se analizará si existe algún tipo de correlación entre mejor secuencia sustrato y mayor efecto sobre la activación. Por otro lado con los resultados obtenidos se realizará una comparación del grado de participación de una misma secuencia, expuesta en un péptido o en su estructura proteica, en la activación de la holoenzima PKA. Para completar el análisis de las secuencias blanco de PKA, de aquellas proteínas que se disponga la cristalización, y por lo tanto de su estructura 3D, se podrán analizar la accesibilidad de los sitios y los entornos que poseen para tratar de inferir cual es el entorno de residuos que es mas favorable para la activación y analizar si existe una correlación entre péptido mejor sustrato y mejor activador.