

Tesis de Posgrado

Estudio del mecanismo de activación de la quinasa de proteínas dependiente de cAMP

Zaremborg, Vanina

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Zaremborg, Vanina. (1999). Estudio del mecanismo de activación de la quinasa de proteínas dependiente de cAMP. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3220_Zaremborg.pdf

Cita tipo Chicago:

Zaremborg, Vanina. "Estudio del mecanismo de activación de la quinasa de proteínas dependiente de cAMP". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3220_Zaremborg.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Estudio del mecanismo de activación de la quinasa de proteínas dependiente de cAMP

Autora: Lic. VANINA ZAREMBERG

Directora: Dra. SILVIA M. MORENO de COLONNA

Lugar de Trabajo:
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA,
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES,
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
(Orientación en Ciencias Biológicas)

1999

100 2 22



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES**

Study of the mechanism of activation of cAMP dependent protein kinase

Author: Lic. VANINA ZAREMBERG

Supervisor: Dra. SILVIA M. MORENO de COLONNA

**Work place:
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,
SCHOOL OF EXACT AND NATURAL SCIENCES,
UNIVERSITY OF BUENOS AIRES**

1999

Agradecimientos

A una de las personas que más admiro.

Por esa rara combinación de ser brillante y humilde a la vez.

A uno de los seres más queridos para mí.

Por su “estilo” en que uno se siente “persona”. Yo me he sentido plena y completa a su lado.

Gracias, porque disfrutamos de la ciencia, con nuestras largas discusiones razonando laberintos, con el placer de entender juntas un concepto complejo.

Gracias Sí, tu confianza, apoyo y cariño me seguirán acompañando.

A Elbis, por el cariño y por permitirme acceder a esos ojitos capaces de reflejar tu inmensa sensibilidad, furiosos ante lo injusto, o a veces, simplemente cansados de ver crecer a Mucor. Gracias por las enseñanzas, las palabras sabias y por esas frases recurrentes y oportunas que condimentan lo cotidiano.

A mi hermana mayor... Por la alegría y la tranquilidad de saberte cerca, siempre. Por tu franqueza y solidaridad, por tanta oreja y por esa mirada que ve siempre más allá. Por horas de protocolos, cuentas, geles, consejos y docencia que pude disfrutar porque estábamos juntas.

Por la felicidad de compartir la grandiosa experiencia de ser madres.

A Clau, por nuestra hermosa amistad que nació allá lejos y que nos mantiene cerca. Por los mimos y cuidados de ayer y de hoy. Por tener tanto que ver con mi futuro...

A Pauli, por lo intenso de un año donde aprendí a quererte. Por la eficiencia de tu trabajo que está reflejada en varias fotos y figuras de esta Tesis. Por cuestionar y hacerme pensar. Mis queridas levaduras no pueden quedar en mejores manos.

A Gabby, mi vida, por tu infinita paciencia y apoyo, indispensables para que esta Tesis llegara a su fin. Por las diapo, el consejo justo, las palabras de aliento y por la tranquilidad, calidez y seguridad que tu enorme presencia me transmite.

A ALU y MARTÍN por las “pilas” cuando más “me” necesitaba. Por la belleza de sus caritas que llenan mi vida y por aguantar a mami en esta etapa final.

A los tres por la felicidad de estar juntos, no importa adonde.

A abuela Betty, por ser y estar, por el apoyo constante, por cuidar con tanto amor de tus nietos. Por enseñarme junto a papi a ser una buena persona, que es tanto en los tiempos que corren...

*A mi abue Rosa, a Gise , a Eli y al recién llegado Alberto.
A Eva, Jojo, Marchu, Deby, Andre, Dany, Eze y Ceci.
A muchos de ustedes, por hacernos "la pata" tantos días y fines de semana.
Especialmente, a mi sobri Luli .
A todos, los quiero mucho. Me encanta ser parte de esta familia.*

*A la gente linda del laboratorio y de la facu. A Cynthi, María Rosa, Udu y Ceci. A la seño Lu, a Mariela y Ale, a Damián, compañero de escritura y pasillos. A todos por el cariño y las palabras amigas.
A Juan Carlos, por tu apoyo incondicional en momentos en que el sistema científico nos tiene acostumbrados a tanta incertidumbre. Gracias por lo generoso de tu persona, aún casi sin conocerme.
A Bella y a Diana, porque disfrutamos de nuestros encuentros, por tanto cariño.
A Willy, por gestar y llevar a cabo el cambio en el Jardín, indispensable para trabajar con tranquilidad.
A la gente, que a través de la UBA, me ha permitido trabajar en lo que más me gusta, privilegio de unos pocos hoy en día.*

A mis amigos del alma, por ser tan compañeros y por la emoción que me provoca decir sus nombres, Deby, Jeffy, Aldo, Ana, Gaby, Tincho, Andy, Edith, Dany, Vane.

RESUMEN

El objetivo general de esta tesis es contribuir al estudio del mecanismo de activación de las proteínas quinasas dependientes de cAMP (PK A). Algunos de los grandes problemas a dilucidar en este tema son: si la enzima necesita disociarse en sus subunidades catalítica y regulatoria para activarse por cAMP, si el cAMP es el único agente necesario para la activación de la enzima y cómo se adquiere la selectividad de sustratos.

Para este trabajo se han utilizado como modelos dos eucariontes inferiores.

- 1) PK A parcialmente purificada del hongo dimórfico *Mucor rouxii*, y ensayos *in vitro*.
- 2) Mutantes de subunidad regulatoria (*bcy1*) de la PK A de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con un abordaje genético-bioquímico-molecular.

Utilizando el primer modelo y trabajando a concentraciones de holoenzima del orden de nM hemos llegado a las siguientes conclusiones (*Mechanism of activation of cAMP-dependent protein kinase. In Mucor rouxii the apparent specific activity of the cAMP activated holoenzyme is different to that of its free catalytic subunit*". V.Zaremborg, A.Donnella-Deana and S.Moreno. Enviado a Archives in Biochemistry and Biophysics).

- en este rango de concentración la actividad enzimática utilizando péptidos sintéticos como sustratos no es lineal con la concentración de enzima. Con la proteína protamina, utilizada como referencia, la actividad es casi lineal en el mismo rango de concentración.
- la dependencia de la actividad fosforilante de cada péptido, con el cAMP, el grado de inhibición por un péptido inhibidor específico y la modulación por policaciones dependen del péptido utilizado.
- en todos los ensayos arriba mencionados la relación de las actividades fosforilantes de la enzima con los distintos péptidos, comparados entre sí o con la protamina, es diferente a la misma relación estimada a partir de las actividades medidas con la subunidad catalítica libre.

Estos resultados se explican con dos modelos posibles: a) la subunidad catalítica libre es la entidad que fosforila los sustratos y el nivel de producción de subunidad C depende del cAMP y del sustrato; b) a altas concentraciones de holoenzima, existe holoenzima sin disociar con cAMP unido; esta especie es catalíticamente activa y la selectividad de esta especie por los sustratos es diferente a la de la subunidad catalítica libre.

En el segundo modelo se han utilizado mutantes espontáneas, cedidas por el Dr. Kelly Tatchell, en el gen que codifica para la subunidad regulatoria (*bcy1*) de la PK A.

En un primer trabajo (*Analysis of the mechanism of activation of cAMP-dependent protein kinase through the study of mutants of the yeast regulatory subunit*. " V.Zaremborg and S.Moreno, Eur.J.Biochem. 237: 136-142, 1996) trabajando con las cepas mutantes se obtuvieron los siguientes resultados:

- los niveles de las subunidades regulatoria (R) y catalítica (C) en las cepas mutadas son similares a los de la cepa salvaje.
- Una medida aproximada de la afinidad de las subunidades R mutadas por el cAMP, indicó que se encuentra disminuída.

- Midiendo actividad de PK A en células permeadas en ausencia y presencia de cAMP, se encontró que las mutantes demuestran actividad dependiente de cAMP, aunque tienen una actividad basal elevada.
- Los fenotipos se hicieron más severos si el fondo genético de las levaduras era RAS2; y permanecieron iguales por sobreexpresión del gen para PDE2.

En la tercera parte de la tesis, y utilizando el mismo modelo de *S.cerevisiae* se encaró la sobreexpresión de algunas de las mutantes *bcy1*: construcción de los vectores correspondientes, estudio de la sobreexpresión y análisis de los fenotipos resultantes. El conjunto de estos resultados (*manuscrito en preparación*) confirma la conclusión que obtuviéramos en la primera parte: las holoenzimas mutadas tienen actividad enzimática.

Del conjunto de los resultados genético-bioquímicos obtenidos hasta ahora en el sistema de las mutantes de levadura hemos concluido, que las holoenzimas mutadas tienen actividad fosforilante de proteínas sin necesidad de disociarse en sus subunidades, que la capacidad fosforilante de proteínas es diferente para cada mutante (diferentes fenotipos) y proponemos que los cambios conformacionales producidos por las mutaciones pueden ser similares a los introducidos por el cAMP al interactuar con la holoenzima.

Summary

The general aim of this thesis is to contribute to the study of the mechanism of activation of cAMP-dependent protein kinases (PK A). Some of the questions to solve on this field are the following: is it necessary for the holoenzyme to dissociate to be activated by cAMP? Is cAMP the only agent that promotes activation? How do the holoenzymes select the substrate to phosphorylate?

In this work we have used two lower eukaryotic models.

- 1) Partially purified PK A from the dimorphic fungus *Mucor rouxii* and *in vitro* assays.
- 2) Mutants of the regulatory subunit (*bcy1*) of protein kinase A from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, using a molecular-genetic-biochemical approach.

Using the first model and working at holoenzyme concentrations in the range of nM we have arrived to the following conclusions (*Mechanism of activation of cAMP-dependent protein kinase. In Mucor rouxii the apparent specific activity of the cAMP activated holoenzyme is different to that of its free catalytic subunit, V.Zaremborg, A.Donnella-Deana and S.Moreno; submitted to Archives in Biochemistry and Biophysics*)

- under this range of enzyme concentration, the enzymatic activity using peptide as substrates is non linear; while it is almost linear when using protamine as substrate.
- the dependency of each peptide phosphorylating activity with cAMP, the degree of inhibition by a specific peptide inhibitor, and the activation by polycations depends on the peptide used as substrate.
- in all the above mentioned assays, the relationship of the apparent specific activity of the holoenzyme with each peptide, is different from the one displayed by the isolated free catalytic subunit.

These results can be explained by two possible models: a) the free catalytic subunit is the enzymatic species that phosphorylates the substrates and the level of production of free C depends on cAMP and on the protein or peptide substrate; b) at high holoenzyme concentration, the existence of the species cAMP-bound holoenzyme is possible; this species is catalytically active and the selectivity for the substrates of this species is different from the one of the free catalytic subunit.

In the second model we have used spontaneous mutants on the *bcy1* gene, isolated and generously provided by Dr. Kelly Tatchell.

In first stage of this approach we have obtained the following results: (*Analysis of the mechanism of activation of cAMP-dependent protein kinase through the study of mutants of the yeast regulatory subunit, V.Zaremborg and S. Moreno, Eur.J.Biochem. 237: 136-142, 1996.*)

- the levels of the regulatory (R) and catalytic (C) subunits of PK A in the mutated strains is similar to the levels of the wild type strain.
- an approximate measurement of the affinity of the mutated R subunits for cAMP indicates that the affinity is decreased.
- measurement of PK A activity in the absence and presence of cAMP in permeabilized mutated and wild type cells indicates that the holoenzymes are dependent on cAMP and that basal activity is high.
- the phenotypes were more severe when working on a wild type RAS2 background; and were maintained alike when overexpression the gene for PDE2 (cAMP phosphodiesterase).

In the third part of this thesis, and using the same model of *S.cerevisiae* mutant strains, we began the overexpression of some of the *bcy1* mutants: vector construction,

analysis of the overexpression and analysis of the derived phenotypes. These results suggest that the mutated holoenzymes are active.

From the results obtained from the molecular genetic approaches, taken as a whole, we conclude that the mutated holoenzymes have catalytic phosphorylating activity without dissociating into its subunits; that the selectivity of substrate phosphorylation for each mutated holoenzyme is different (different phenotypes) and we propose that the conformational structural changes produced by the mutation can be similar to the changes promoted by cAMP upon interaction with the holoenzyme.

Indice General

Objetivo general	1
Introducción general	2
Transducción de señales por cAMP	2
Subunidad catalítica	3
1-Sitio de unión de ATP	4
2-Sitio de unión del sustrato y actividad fosfotransferasa	5
3-Modificaciones post-traduccionales de la subunidad catalítica	6
Subunidad regulatoria	7
Estructura de dominios de la subunidad regulatoria	8
1-Dimerización de la subunidad R	10
2-Región bisagra. Interacción con la subunidad catalítica	10
3-Unión de cAMP	12
4-Localización subcelular	12
Inhibidor termoestable de la PK A (PKI)	15
Holoenzima	16
Composición y características de las isoenzimas	16
Expresión diferencial	16
Regulación hormonal	17
Activación y reasociación de la holoenzima	17
Análisis de la interacción R/C	18
Estructura cuaternaria de la holoenzima	20
Estructura de C como componente del dímero R-C	20
Estructura de R libre, unida a cAMP o como componente del dímero R-C	20
Modelo de estructura cuaternaria de la holoenzima	21
Especificidad de sustrato de la PK A	22
Control de la síntesis y la degradación de las subunidades de la PK A	27
Estudio del mecanismo de activación de la PK A	28
Línea 1	
Objetivo	30
Resultados	31
Antecedentes: Quinasa de proteínas dependiente de cAMP de <i>Mucor rouxii</i>	31
Constantes cinéticas para la fosforilación de péptidos por la subunidad catalítica de la PKA de <i>Mucor rouxii</i>	32
Activación por cAMP y sustrato	34
Dependencia de la actividad con la concentración de holoenzima y el sustrato	37

Efecto del péptido inhibidor sobre la actividad de la holoenzima	38
Modulación de la activación de la PK A por policationes	39
Discusión	42
 Línea 2	
Objetivo	46
Introducción: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
Transducción de señales en levaduras	47
Transducción de señales inducida por glucosa	48
Camino principal de represión por glucosa	50
Transducción de señales vía PK A	51
Propiedades fenotípicas controladas por PK A	51
Señalización a través de la adenilato ciclasa	53
1-Camino RAS-adenilato ciclasa	53
2-Sistema Gpr1-Gpa2. Activación de AC inducida por glucosa	58
Observaciones sobre Ras y Gpa2	59
Sustratos de PK A en <i>S. cerevisiae</i>	60
Transducción de señales inducida por combinación de nutrientes: el camino inducido por crecimiento en medio fermentable (FGM)	63
Localización subcelular de la PK A de <i>S. cerevisiae</i>	65
Resultados	67
Antecedentes: Reversión de fenotipos <i>ras2</i> por mutaciones en el gen <i>BCY1</i>	67
Estrategia general de la Línea 2	69
Consideraciones metodológicas	71
Niveles totales de C y R en las mutantes <i>bcy1 ras2</i>	74
Dependencia de la actividad PK A con cAMP	76
Fenotipos de mutantes <i>bcy1</i> en fondos genéticos <i>ras2::LEU2</i> y <i>RAS2</i>	77
Sobreexpresión de la fosfodiesterasa de alta afinidad (<i>PDE2</i>)	79
Sobreexpresión de la subunidad regulatoria salvaje y las variantes <i>bcy1</i> en las cepas de <i>S. cerevisiae</i> correspondientes	81
Estrategia de clonado de cada variante <i>bcy1</i> en vectores de expresión en levaduras	82
Sobreexpresión de la subunidad R salvaje, <i>bcy1-16</i> y <i>bcy1-14</i>	83
Determinación de actividad ligante de [³ H]cAMP	84

Análisis por SDS-PAGE / tinción con Coomassie blue y Western blot	84
Análisis fenotípico	86
Viabilidad	88
Termosensibilidad	88
Niveles de glucógeno	89
Respiración	89
Shock de calor	90
Actividad de PK A en preparaciones semipurificadas	91
Dependencia de la actividad de PK A con cAMP en células permeadas	91
Caracterización bioquímica preliminar de las subunidades R mutadas	94
Curvas de saturación y análisis de Scatchard	94
Competencia de la unión del [³ H]cAMP con análogos selectivos de sitio	95
Velocidad de disociación	96
Discusión	101
Conclusiones generales	105
Materiales y métodos	106
Sección I	
Línea 1	
Organismo utilizado	106
Obtención de esporas y mantenimiento de la cepa	106
Preparación de holoenzima (PK A) parcialmente purificada	106
Preparación de subunidad catalítica parcialmente purificada	107
Centrifugación en gradientes de sacarosa	107
Ensayos de actividad de PK A	107
Medición de actividad quinasa	107
Inhibición de actividad quinasa por el inhibidor termoestable PKI	108
Medición de actividad ligante de [³ H]cAMP	108
Otras actividades enzimáticas	109
Peroxidasa, catalasa, citocromo C	109
Línea 2	
Organismos utilizados	110
Cepas de <i>S cerevisiae</i>	110
Cepas bacterianas	111
Métodos de Biología Molecular	111
Cepas bacterianas competentes	111
Transformación de cepas bacterianas	112
Obtención de ADN plasmídico	112
Elución de ADN plasmídico	112
Mutagénesis sitio dirigida	113

Reacción de PCR	113
Métodos de Genética de levaduras	113
Construcción de cepas y análisis de tetradas	113
Transformación de levaduras	113
Preparación del material biológico para ensayos bioquímicos	114
Preparación de extractos	114
Preparación de células permeabilizadas	114
Preparación de PDE parcialmente purificada	114
Sobreexpresión y semipurificación de subunidad R de PK A	115
Ensayos bioquímicos	116
Medición de actividad fosfodiesterasa	116
Medición de actividad de PK A en extractos crudos	116
Medición de actividad de PK A en células permeabilizadas	117
Determinación de actividad de la subunidad R en extractos crudos	117
Velocidad de disociación de [³ H]cAMP unido	117
Medición de la liberación de [³ H]cAMP unido inducida por C	117
Curvas de competencia con análogos de cAMP selectivos de sitio	118
Corrida en SDS/PAGE	11/8
Western blot	118
Técnicas generales	119
Determinación de proteínas	119
Medición de la radiactividad	119
Buffers	120
Medios	121
Reactivos	122

Sección II

Estrategia de clonado	123
1-Subclonado del gen <i>BCY1</i> salvaje en Bluescript SK (-)	124
2- Mutagénesis sitio dirigida para la creación de un sitio de corte <i>Nco1</i> que contenga el primer ATG del gen <i>BCY1</i>	126
3- Subclonado de <i>BCY1</i> en YEp51 quedando bajo el promotor inducible GAL10.	128
4- Intercambio de los fragmentos BspE1-EcoR1	130
5- Subclonado de las variantes <i>bcy1</i> en YEp51	132
Reacción de PCR	133
Sobreexpresión y funcionalidad <i>in vivo</i>	135
Subclonado de <i>BCY1</i> en pCB-GST quedando fusionado a GST bajo el promotor inducible <i>CUP1</i>	136
Sobreexpresión de la fosfodiesterasa (PDE2/SRA5) de baja Km	138

Construcción de cepas bcy1 Δ pep4

140

Bibliografía

141

Apéndice final

Hipótesis general

El mecanismo de activación de la PK A, *in vivo*, es más complejo que la simple disociación de sus subunidades R y C en respuesta a un incremento de las concentraciones intracelulares de cAMP.

Objetivo general:

Estudio del mecanismo de activación de la proteína quinasa A (PK A) *in vivo*.

on genera

Transducción de señales por cAMP

La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo clave, que afecta casi todos los aspectos del crecimiento y la homeostasis en células eucariontes. La primera demostración de que la fosforilación regulaba la actividad de una enzima se realizó en la glucógeno fosforilasa en respuesta a glucagon (Fischer & Krebs, 1955; Sutherland & Wosilait, 1955,). El paso siguiente fue la identificación de un factor termoestable que mediaba el efecto del glucagon: el 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (Sutherland & Rall, 1958). Así comenzó a desarrollarse el concepto de que el cAMP era el segundo mensajero intracelular de un amplio rango de hormonas, neurotransmisores y otros caminos de señalización celular (Robison *et al.*, 1971; Botsford, 1981; Pall, 1981). Posteriormente se purificó una quinasa de proteínas regulada por cAMP a la que se denominó quinasa de proteínas dependiente de cAMP (PK A; EC 2.7.1.37) (Walsh *et al.*, 1968) y que hasta ahora es el blanco intracelular principal de este nucleótido cíclico.

Dentro de la familia de quinastas de proteínas, la PK A es única, ya que es la única regulada por interacción con una subunidad disociable y distinta de la subunidad catalítica; esta última es además una de las subunidades catalíticas más simples de las quinastas de proteínas (Taylor & Radzio-Andzem, 1994).

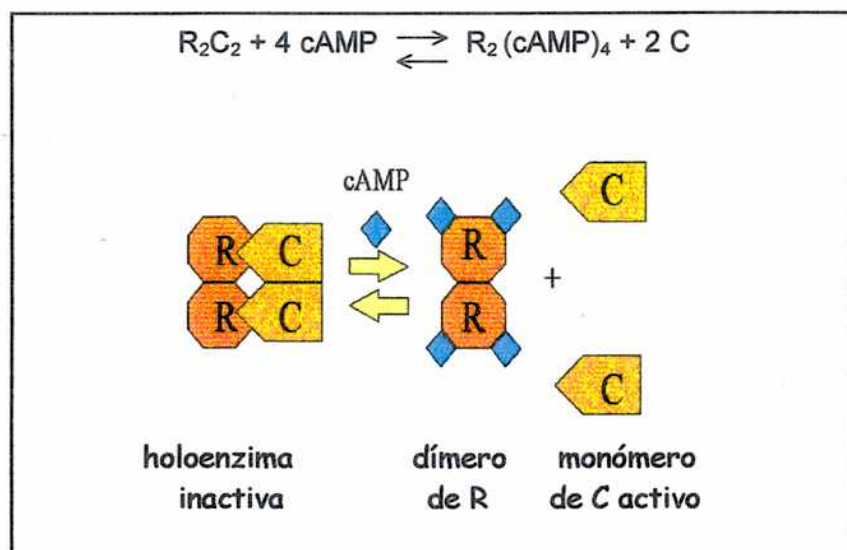


Figura 1- La relación entre las subunidades C libres, el dímero de subunidades R y la holoenzima intacta es un equilibrio que está determinado por distintos factores, que incluyen la concentración relativa de subunidades de PK A, los niveles de cAMP, la concentración salina, el pH y la temperatura.

La PK A es un tetrámero formado por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C). La subunidad reguladora posee dos sitios de unión a cAMP; la unión de este nucleótido a la R es cooperativa y altera su afinidad por la subunidad C

promoviendo la disociación de esta enzima en un dímero de subunidad regulatoria con cuatro moléculas de cAMP unidas y dos subunidades catalíticas monoméricas activas (Figura 1, Beebe & Corbin, 1986). La subunidad C fosforila sustratos proteicos específicos en residuos serina o treonina.

Subunidad Catalítica

Se han identificado tres formas de subunidad catalítica en tejidos de mamíferos $C\alpha$, $C\beta$ y $C\gamma$. Entre $C\alpha$ y $C\beta$ las secuencias de aminoácidos difieren aproximadamente un 7% (Shoji *et al*, 1983; Lee *et al*, 1983). La isoforma $C\alpha$ se expresa constitutivamente en la mayoría de las células, mientras que la $C\beta$ es tejido específica (Showers *et al*, 1986; Hedin *et al*, 1989). La tercer isoforma de subunidad catalítica $C\gamma$, muestra una identidad del 79% y 83% con $C\alpha$ y $C\beta$ respectivamente (Beebe *et al*, 1990).

La secuencia de aminoácidos y el tamaño de la subunidad C están altamente conservados entre las especies, en las que se ha clonado esta subunidad (Scott, 1991).

Estructura de la subunidad catalítica

La subunidad catalítica (Figura 2) contiene una región de aproximadamente 250 aminoácidos, común a todas las proteína quinasas, zona que es conocida como núcleo catalítico (Hanks *et al*, 1988).

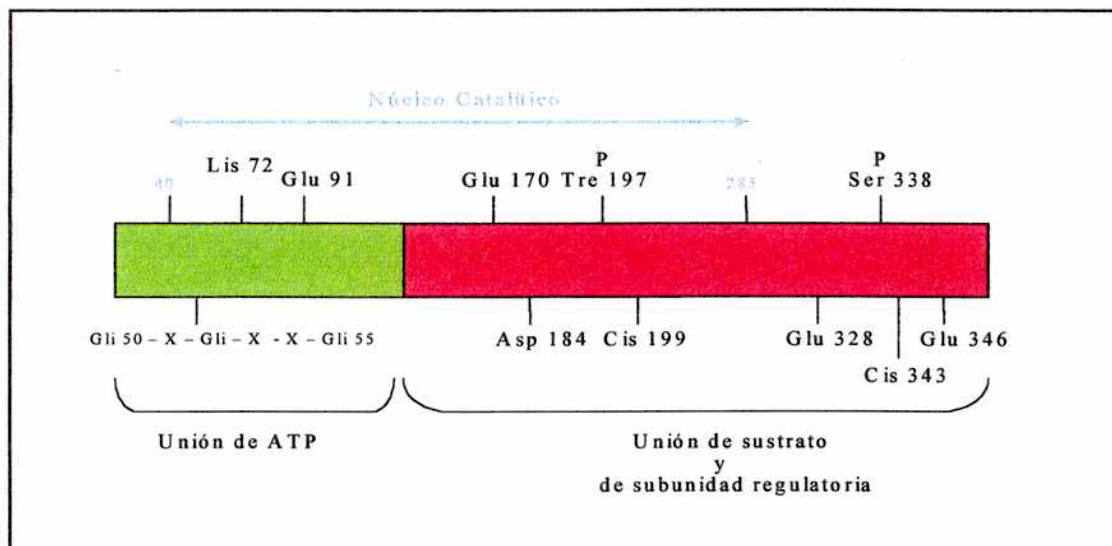


Figura 2-Subunidad catalítica de PKA. Estructura de dominios.

Esta región está comprendida entre los residuos 40 a 285, y está compuesta de varias secuencias conservadas; así se pueden identificar residuos y regiones que son esenciales para la actividad catalítica, para la unión de ATP-Mg y unión del sustrato. La enzima consiste en dos "lóbulos", uno pequeño de unión a ATP-Mg y uno mayor asociado con el reconocimiento del sustrato peptídico y la actividad catalítica.

La estructura tridimensional de la subunidad C de la PKA fue la primera en ser resuelta a través del estudio de la estructura cristalográfica de la subunidad C unida al PKI (péptido inhibidor) (Figura 3). Posteriormente se comprobó que esta estructura bi-lobular era compartida por otras quinasas como la MAPK y CDK.

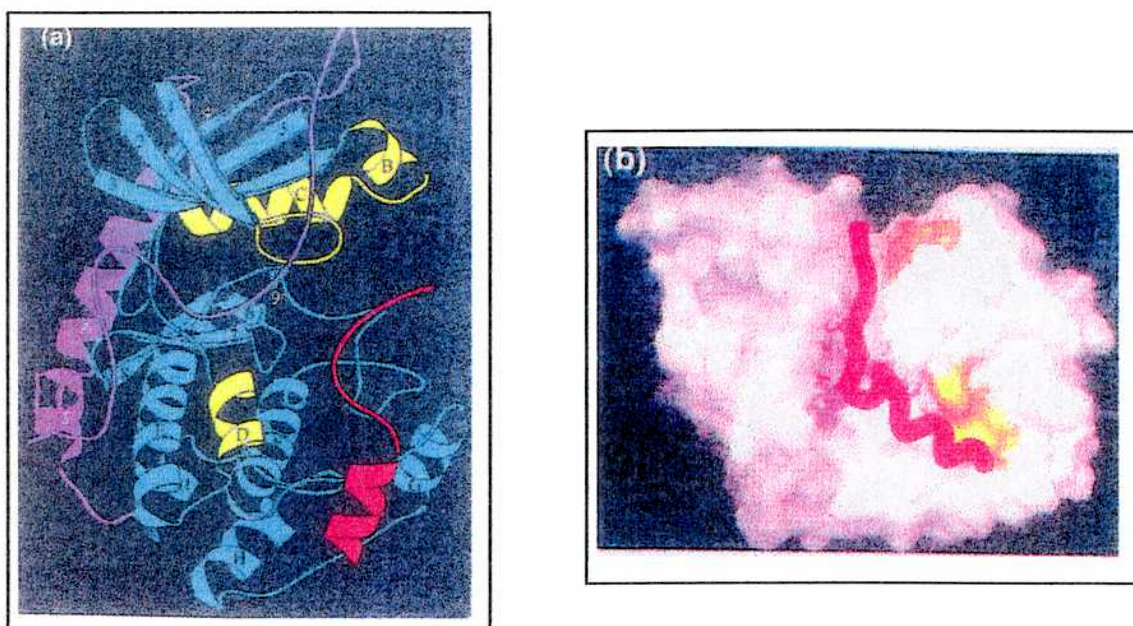


Figura 3 A- Diagrama de la subunidad catalítica de PKA. Dentro de la estructura bilobular, las α -hélices y las cadenas β son de color verde, excepto D, B y C (amarillas). El PKI (rojo) se une entre las hélices D y G.

B- Representación de superficie de C con el PKI (rojo) unido. Los bolsillos hidrofóbicos en las posiciones P-11 y P+1 del PKI (ver más adelante), están en amarillo. Los residuos ácidos responsables de la unión de las argininas del PKI están representadas de color azul.

1-Sitio de unión de ATP

Para que ocurra la catálisis, la subunidad catalítica debe unir el sustrato peptídico y un segundo sustrato que es el ATP. Estos se unen con alta afinidad a sitios diferentes en la subunidad catalítica. El ATP se une en un sitio ubicado en la porción amino terminal de la C. Mediante el uso de mutagénesis y modificaciones químicas en C, se identificó primeramente en este sitio a la Lis72 como residuo importante (Zoller & Taylor, 1979). Luego se confirmó que la región flanqueante de este residuo también era importante en la unión de ATP (Buechler *et*

al, 1989); dentro de esta región se vio que Cis199 y Cis343 también estaban involucradas en la unión de ATP (Puri *et al*, 1985).

El núcleo catalítico de todas las proteínas quinasas contiene una lisina o arginina invariable que corresponde al residuo 72 y que interactúa con el fosfato γ del ATP (Zoller & Taylor, 1979).

La región de unión de ATP está localizada 20 residuos antes de Lis72, y posee una secuencia rica en glicinas: **Gly-Thr-Gly-Ser-Phe-Gly-Arg-Val**, la cual es conservada en todas las quinasas (Hanks *et al*, 1988); la misma posición de las glicinas está presente en otras proteínas que unen nucleótidos. El modelo propuesto para el plegamiento de este segmento rico en glicinas comienza con una cadena β en los residuos 40-45, seguida por una estructura de hélice α , que contiene la secuencia rica en glicinas y termina con otra cadena β que incluye a la Lis72 hacia el final de la misma. Este residuo estaría muy próximo espacialmente a esta región rica en glicinas.

También participan adicionalmente de la unión de ATP grupos carboxilo; estos grupos unen Mg^{++} , formando un complejo ternario con el Mg^{++} -ATP. (Granot *et al*, 1980); se identificaron dos grupos carboxilo reactivos, Asp184 y Glu91 (Buechler & Taylor, 1988).

2-Sitio de unión del sustrato y actividad fosfotransferasa

La subunidad catalítica reconoce como sustratos, péptidos que contienen dos aminoácidos básicos separados por uno o dos residuos de la serina o treonina que es fosforilada (secuencia consenso: RRXS). La actividad catalítica consiste en la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la serina o treonina de la cadena polipeptídica. Grupos carboxilo participan en el reconocimiento y transferencia de fosfato al sustrato peptídico, se cree que es por unión con los residuos básicos del sustrato. Se demostró que Glu170 y un grupo de varios residuos ácidos que se encuentra en el extremo carboxilo-terminal de la molécula, participarían en el reconocimiento del sustrato (Buechler & Taylor, 1990). Cis199, Glu346 y Tre197 formarían también parte del sitio activo (Mosbashery & Kaiser, 1988). Este último residuo tiene un interés particular ya que está fosforilado en la subunidad catalítica.

Actualmente además se le asigna un rol importante a His87 no sólo en la interacción con los sustratos sino también en la interacción con R (Cox & Taylor, 1994).

La subunidad catalítica sufre cambios conformacionales cuando el sustrato se une a ella.

En la subunidad catalítica ocurren dos modificaciones post-traduccionales, por un lado la glicina amino terminal es miristoilada y por otro lado esta subunidad es fosforilada en dos sitios.

A diferencia de proteínas como las quinasas de la familia *src*, donde el grupo miristoil confiere la capacidad de asociarse a membrana, en el caso de la subunidad C de la PK A estabiliza su estructura secundaria. El grupo acilo se pliega dentro de la proteína estableciendo contactos importantes con varias regiones distintas de la cadena polipeptídica (Zheng *et al*, 1993).

La fosforilación de la subunidad C ocurre en Thr197 y Ser338 (Shoji *et al*, 1983). Ambas fosforilaciones tienen importancia a nivel estructural. Ser338 interactúa con Lys342 y estabiliza una lazada ("loop") cerca de la cola C-terminal (Zheng *et al*, 1993).

Del análisis cristalográfico del complejo binario formado por la subunidad C y el péptido inhibidor surge que el fosfato de Thr197 es el principal sitio de contacto directo entre los dos lóbulos anteriormente mencionados. Esta fosfotreonina es necesaria no sólo para el reconocimiento del sustrato sino también para la interacción con la subunidad reguladora de la quinasa (Levin *et al*, 1988). Evidencias genéticas indican que la superficie interlobular donde se ubica Thr197 también es importante para la interacción con la subunidad R en la enzima de levaduras (Gibbs *et al*, 1992). Se ha demostrado, por otro lado, que esta fosforilación es el resultado de autofosforilación y que sería un paso crítico para la activación de la subunidad C (Steinberg *et al*, 1993). Haciendo sustituciones de este aminoácido por aspártico o glutámico se demostró que era necesario que en la posición de la treonina hubiera un grupo cargado negativamente para que ocurra la unión con la R (Levin & Zoller, 1990). Se postula que esta fosforilación provocaría cambios que son importantes para generar el estado conformacional activo de muchas proteínas quinasas (Zheng *et al*, 1993).

Se ha descrito un sitio adicional a estos dos correspondiente a Ser10, pero que no tendría efecto alguno sobre la actividad de la enzima (Toner-Webb *et al*, 1992).

Subunidad Regulatoria

La subunidad regulatoria es el principal receptor intracelular de cAMP descrito hasta ahora. Otros mediadores eucariotas de efectos de este nucleótido cíclico son el receptor superficial de cAMP en *Dictyostelium discoideum*, el canal de calcio regulado por cAMP y posiblemente la quinasa de proteínas dependiente de cGMP (Døskeland *et al*, 1993). Inicialmente, se identificaron dos isoenzimas diferentes de PK A, llamadas de tipo I y de tipo II (PK A_I y PK A_{II}, respectivamente), basadas en el patrón de elución de columnas de DEAE-celulosa (Reimann *et al*, 1971). Las PK A_I y PK A_{II} que eluyen a concentraciones salinas de entre 25 - 50 mM y 150 - 200 mM NaCl, respectivamente, contienen subunidades C asociadas a dos tipos de subunidades regulatorias denominadas R_I y R_{II} (Døskeland *et al*, 1993). Sin embargo, mediante técnicas de clonado molecular se ha revelado en los últimos 10 años la existencia de una gran heterogeneidad de formas tanto para las subunidades C (mencionadas anteriormente) como para las subunidades R, evidenciando la posible formación de múltiples isoenzimas. Se han clonado isoformas de cada tipo de R, R_{Iα} (Lee *et al*, 1983), R_{Iα} (Scott *et al*, 1987), que son expresadas en la mayoría de los tipos celulares, aunque varían las proporciones relativas de cada una ; por otro lado se ha encontrado que R_{Iβ} (Clegg *et al*, 1988) y R_{IIβ} (Jahnsen *et al*, 1986), son más específicas de tejido. R_{Iα} y R_{Iβ} son distintas pero presentan una alta homología (81% identidad a nivel de secuencia aminoacídica) al igual que R_{IIα} y R_{IIβ} (68% identidad a nivel de secuencia aminoacídica). La expresión de algunas isoformas parece ser constitutiva y la expresión de otras inducible. Recientemente se ha demostrado la existencia de variantes de la especie R_{Iα}, producto de maduración alternativa de un mRNA ("splicing alternativo"). Se han encontrado distintos cDNAs que difieren en su exón líder, cuya iniciación de la transcripción está diferencialmente regulada desde dos promotores diferentes en el gen que codifica para R_{Iα} (Skálhegg & Taskén, 1997). Las R_I y R_{II} difieren no solo en peso molecular y secuencia de aminoácidos sino también en su estado de fosforilación y localización subcelular. En cuanto a su estado de fosforilación, la R_{II} puede ser fosforilada por la subunidad C mientras que la R_I no (Rosen & Erlichman, 1975; Hoffmann *et al*, 1975). Tanto la subunidad R_I como R_{II} son fosforiladas por otras quinasas de proteínas, la R_I es fosforilada por PKG, en una serina próxima al sitio de pseudosustrato (Hashimoto *et al*, 1981), la R_{II} es fosforilada en Ser95 por la misma PKA (Rangel-Aldao & Rosen, 1977), y además tiene otros cuatro sitios de fosforilación más que están entre los residuos 44 y 76, y son fosforilados por la glucógeno sintetasa quinasa y la caseína quinasa II (Hemmings *et al*, 1982).

Estructura de dominios de la subunidad regulatoria

La subunidad regulatoria es típicamente un dímero muy asimétrico; esta asimetría parece estar mantenida también en la holoenzima (Zoller & Taylor, 1979; Zhao *et al*, 1998)). La estructura de dominios de la subunidad regulatoria incluye los dominios de:

- dimerización y localización subcelular o de unión a proteínas de anclaje (AKAPs),
- región bisagra (incluye secuencia pseudosustrato en R_I / sustrato en R_{II})
- y de unión de cAMP

Un esquema de estos dominios, ilustrado en particular con la $R_{I\alpha}$ se muestra en la Tabla 1 y Figura 4. La tercera parte de la molécula del lado amino-terminal participa de las interacciones proteína-proteína, mientras que las dos terceras partes de la molécula, del lado carboxilo-terminal contiene dos secuencias repetidas en tandem las cuales conforman los dominios de unión de cAMP.

Tabla 1- Organización de dominios de $R_{I\alpha}$

Dominio	Residuos	Función	Interacción
Dimerización/ anclaje (DD)	12-61	Formación del dímero Localización subcelular	Otro protómero de R AKAPs
Sitio consenso inhibitorio (IS)	94-98	Unión al sitio activo de C	C
Sitio A de unión a cAMP (cA:A)	140-260	Unión de cAMP en estado activado Unión de C en ausencia de cAMP	cAMP C cA:B
Sitio B de unión a cAMP (cA:B)	261-379	Unión de cAMP en estado activado	cAMP cA:A

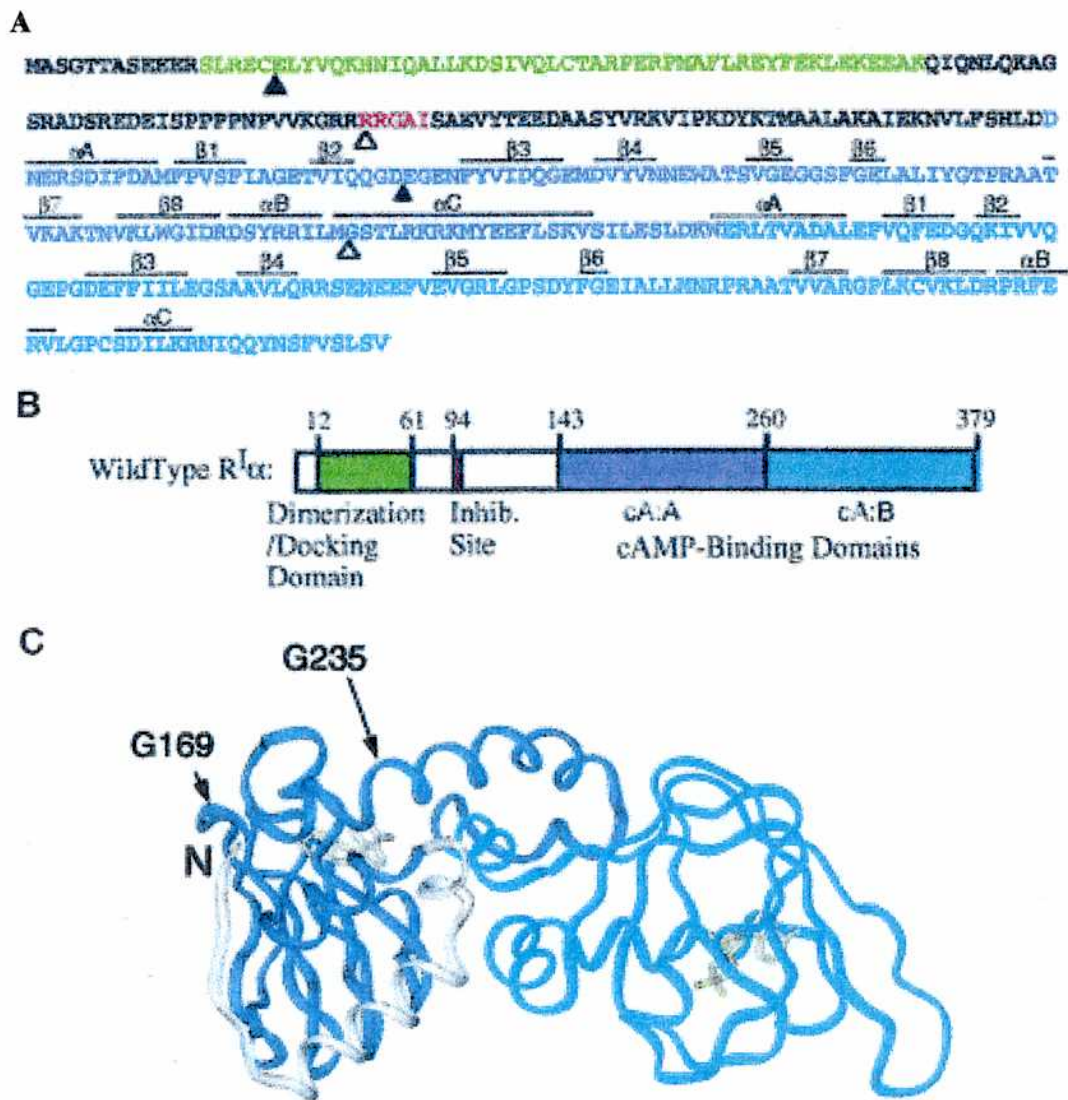


Figura 4-Secuencia aminoacídica de R^{Iα}, la secuencia consenso RRGAI está marcada en rojo (A), diagrama esquemático (B) y modelo cristalográfico (C). Se han utilizado los mismos colores para identificar los distintos dominios presentes en R, tanto en la tabla 1 como en A, B y C. El cAMP en la estructura se muestra en amarillo.

1-Dimerización de la subunidad R

La subunidad regulatoria forma un dímero estable, que permanece intacto después de la liberación de las subunidades catalíticas. Las únicas subunidades regulatorias que no forman dímeros son las de *Dictyostelium discoideum* (Mutzel *et al*, 1987) y *Saccobolus platensis* (Silberstein *et al*, 1990).

La región de dimerización fue descubierta al observar que el clivaje proteolítico de la región bisagra de la molécula podía producir una subunidad R monomérica que retenía su actividad de unión de cAMP (Potter *et al*, 1978).

En R_I, los monómeros están unidos covalentemente por uniones disulfuro formadas entre los residuos Cis16 y Cis37 (Zick & Taylor, 1982). La dimerización de R_{II} no involucra cisteínas, sino que es mantenida por interacciones entre los residuos del extremo amino-terminal. Quedó determinado que los residuos 1-30, representan el dominio de dimerización (Scott *et al*, 1990).

2-Localización subcelular

La localización subcelular de la PKA está dirigida por la subunidad R. La R_I es principalmente citoplasmática y la R_{II} es generalmente particulada y se la encuentra asociada a membrana citoplasmática, citoesqueleto, gránulos secretorios o membranas nucleares. Sin embargo la tasa de PK A_{II} soluble a particulada varía y probablemente depende del nivel de expresión de R_{II} y del nivel específico de proteínas que unen y anclan a R_{II} (Taskén *et al*, 1997). La localización de la R_{II} está dada por la asociación de esta subunidad con proteínas específicas denominadas "proteínas de anclaje" o "AKAPs" (del inglés A Kinase Anchoring Proteins) (Scott & McCartney, 1994; Rubin *et al*, 1979; Carr *et al*, 1991). Estas proteínas presentan una hélice anfipática conservada responsable de su asociación con estructuras celulares. La anulación de la interacción de AKAP/PK A mediante competencia con péptidos que reproducen esta región anfipática bloquea respuestas a cAMP (Scott, 1997). Se cree que la función tejido específica está asociada a la localización subcelular por las proteínas de anclaje, lo que haría que los sustratos fueran más accesibles a la quinasa. Se ha demostrado que varias de las proteínas identificadas como de anclaje para R_{II}, son sustrato de la PK A, por lo tanto estas proteínas tendrían un rol muy importante en la transducción de señales por cAMP. Más aún, se ha encontrado recientemente que calcineurina (fosfatasa 2B), PK C y PK A_{II} colocalizan a través de su unión a AKAP79. Esto sugiere un nuevo modelo para la fosforilación reversible de proteínas en el cual actividades opuestas como las de quinasa y fosfatasa se encontrarían formando un complejo transductor de señales gracias a su asociación con una proteína de anclaje común. Hasta el presente se han identificado 36

AKAPs y se sugiere que algunas células expresarían entre 10 a 15 AKAPs diferentes localizadas en distintos compartimentos (Figura 5)

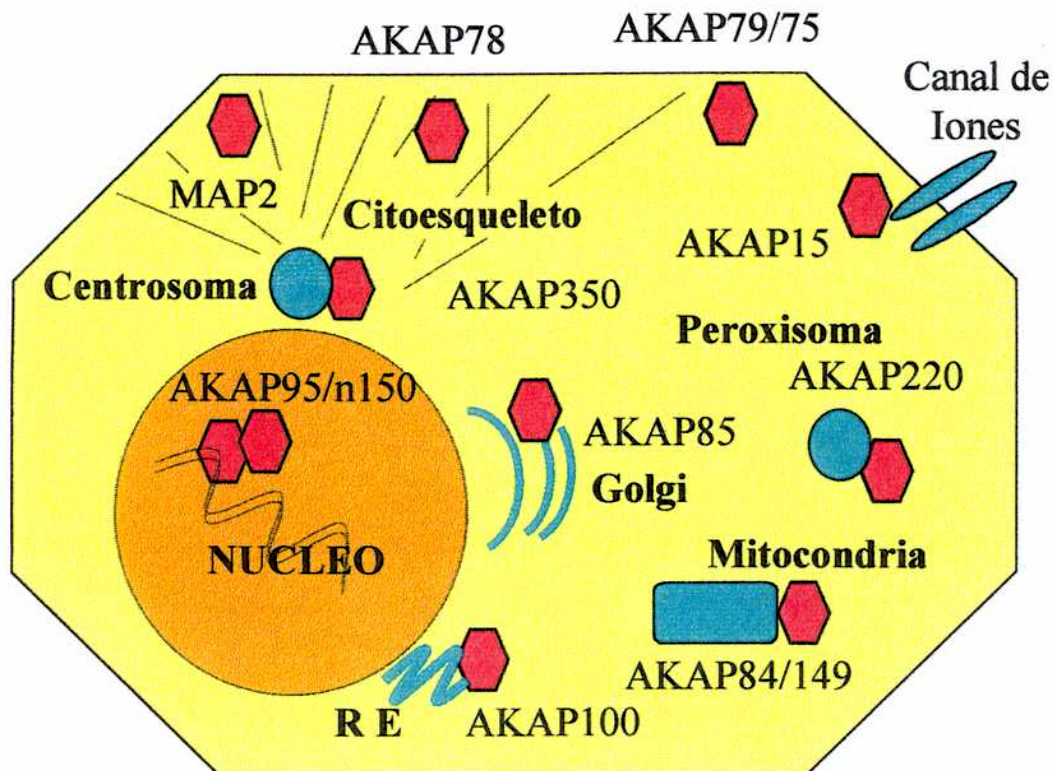


Figura 5-Distribución intracelular de algunas de las AKAPs más conocidas.

Si bien la mayoría de las AKAPs descritas se asocian con R_{II} , va en aumento el número de trabajos que describen la asociación de R_I con componentes subcelulares, fuera del citoplasma. En células T, $R_{I\alpha}$ se asocia con el complejo TCR/CD3 luego de la activación de la célula T y del "capping" (Skalhegg & Taskén, 1997). Se ha demostrado que esta misma subunidad es capaz de unirse a la proteína adaptadora Grb2, lo que le permitiría a la PK A_i interactuar con el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Es interesante la descripción de una AKAP (D-AKAP1) de especificidad dual, tanto por $R_{I\alpha}$ como por $R_{II\alpha}$ (Skalhegg & Taskén, 1997). Se ha encontrado recientemente una proteína AKAP en *C. elegans*, en el cual existe una sola PK A con alta homología con las PK A de tipo I (Angelo et al, 1998). No se han descrito aún este tipo de proteínas en eucariontes inferiores.

3-Región bisagra. Interacción con la subunidad catalítica

En ausencia total de cAMP la subunidad R inhibe la actividad de la subunidad C. La región principal, pero no la única, que es esencial para la interacción con la subunidad catalítica, es la región conocida como "bisagra", que se encuentra entre los residuos 90 y 100 en la subunidad regulatoria. Esta zona es sensible al clivaje proteolítico, en particular por tripsina, y está protegida del mismo cuando la R forma parte de la holoenzima. Por modificación de las argininas de R_{II} con 2,3-butanodiona se demostró que estos residuos eran importantes en la interacción con C (Corbin *et al*, 1978). Las secuencias presentes en esta región son semejantes a las presentes en los sustratos que son fosforilados por la subunidad C (Takio *et al*, 1984). La subunidad R_I posee, en esta región, una secuencia de pseudosustrato o pseudofosforilación Arg-Arg-Gly-Ala/Gly-Ile-Ser en la cual la posición Ser fosforilable está remplazada por Ala o Gly. La R_{II} tiene un sitio de autofosforilación en la secuencia Arg-Arg-Val-Ser-Val-Cys. La autofosforilación de la serina reduce la afinidad de R por C casi 10 veces ((Rangel-Aldao & Rosen, 1977).

Por proteólisis del extremo amino-terminal dejando esas dos argininas se produce una subunidad R que puede unir C, pero si la proteólisis alcanza a las argininas, la R no puede formar un complejo de alta afinidad con C; por mutagénesis dirigida se demostró que por lo menos una de las dos argininas conservadas en la región "bisagra" es necesaria para la unión fuerte entre R y C (Mumby *et al*, 1985; Buechler *et al*, 1993).

4-Unión de cAMP

Cada monómero de R posee dos sitios de unión de cAMP, localizados después del sitio de dimerización y la región de pseudosustrato. Estos sitios son denominados sitio A y sitio B, y son el resultado de un proceso de duplicación génica (Shabb & Corbin, 1992). Ambos sitios tienen diferentes velocidades de intercambio de cAMP y especificidades por los análogos de cAMP. El sitio A tiene preferencia por los análogos sustituidos en N-6 y C-6, mientras que el sitio B tiene preferencia por los sustituidos en C-8 (Shabb & Corbin, 1992). Estos sitios actúan de manera sinérgica durante la activación de PKA (Døskeland & Øgreid, 1984). Los dominios de unión de cAMP muestran similitud de estructura con la proteína CAP o CRP de *E.coli* (Weber *et al*, 1982). Cada dominio de unión de cAMP está formado por tres hélices α y ocho cadenas β , que se distribuyen espacialmente para formar un bolsillo al cual se une el nucleótido cíclico (Figura 6).

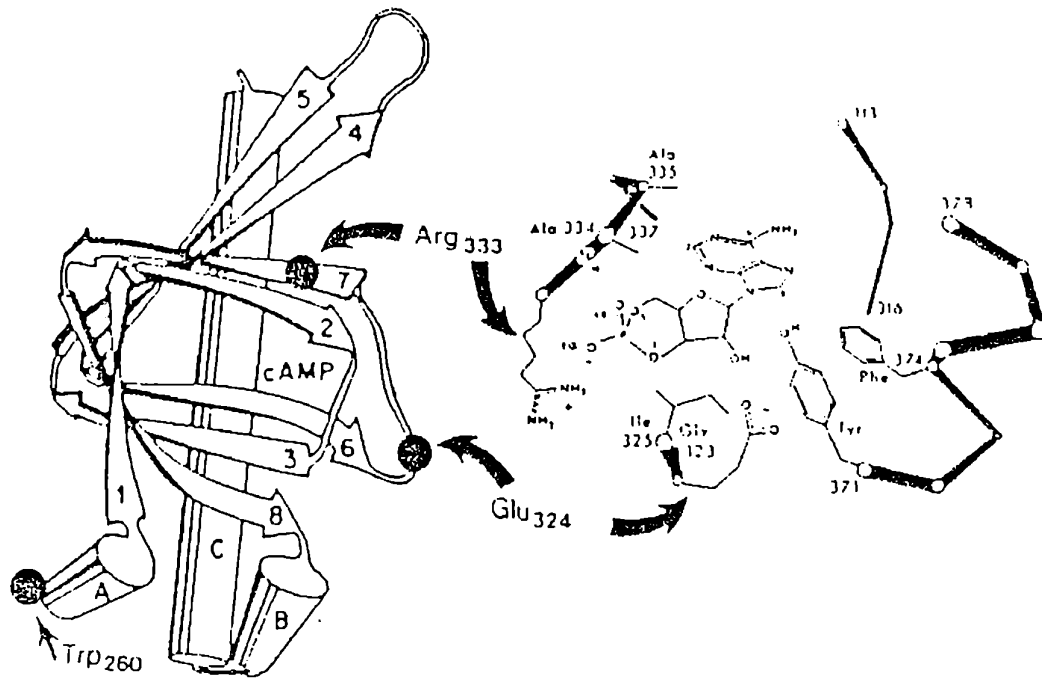


Figura 6- Modelo para el dominio B de unión de cAMP, basado en la estructura cristalina de CAP. A la derecha están representadas las estructuras de plegamiento, a la izquierda se muestra el entorno de unión de cAMP, están destacados la Arg333 el Glu324, y el Trp260 que está justamente en el límite entre el dominio A y el dominio B.

Existen interacciones entre los dos sitios de unión de cAMP, que son de naturaleza diferente en la holoenzima y en la subunidad R libre. La unión de cAMP al sitio A de la R libre, limita la disociación del cAMP unido al sitio B y a su vez limita la entrada de cAMP al sitio B. Estos dos efectos (disminuir la probabilidad tanto de la disociación como de la asociación de cAMP al sitio B) se anulan uno al otro, de manera tal que en la subunidad R libre no hay un efecto neto de la ocupancia de un sitio sobre la afinidad de cAMP en el otro (Døskeland *et al*, 1993).

En la holoenzima, la unión de cAMP al sitio B aumenta la afinidad del sitio A por este nucleótido. Por lo tanto la unión a un sitio aumenta la probabilidad de unión estable del nucleótido al otro sitio en el complejo $R_2C_2cAMP_2$, y una vez que ambos sitios han sido ocupados, la subunidad C tiene mayor probabilidad de disociarse de la R.

A continuación se presenta un detalle de las conclusiones resultantes de los estudios de cristalización de una R mutada de mamíferos (RI Δ 1-91 bovina recombinante) que llevaron a postular a los aminoácidos indicados en cada caso como importantes para la interacción con el cAMP o para la cooperatividad entre sitios. Cabe destacar que la única manera de obtener

un cristal fue con cAMP unido y que en esta R mutada los primeros 21 residuos (hasta Arg113) no presentan una estructura definida.

ANÁLISIS DEL ESTUDIO CRISTALOGRAFICO DE R₁ Δ1-91 UNIDA A cAMP (Su et al, 1995)

SITIO A	SITIO B
Aminoácidos que interaccionan de manera directa con cAMP en cada sitio (posiciones equivalentes)	
G199	G323
E200	E324
A202	A334
R209	R333
Aminoácidos que contribuyen a la estabilización de la unión del cAMP	
R241	Y371
E267	E289
W260	
D170	
N171	

Observaciones

- E 200/ 324 interacciona con el 2'-OH de la ribosa del cAMP
- AAs aromáticos se apilan con el anillo de adenina del cAMP
- R209 interacciona con el oxígeno exocíclico ecuatorial del fosfato del cAMP
- A202 hace pte de H con este oxígeno
- L203 interactúa con L201 la cual establece relaciones de Van der Waals con la base del cAMP

Aminoácidos con múltiples contactos

E200	E324
• 2'-OH ribosa	• 2'-OH ribosa (que interactúa también con G323 que a su vez está estabilizada por R333 que tiene un rol estructural)
• pte H con W260	• interacción con el OH-fenólico de Y371 (importante para fijar el dipolo y orientar el momento dipolar de la adenina)
• estabilizado por contactos electrostáticos con R241	• no interacciona con una R comparable
	• interactúa con su propio grupo amida
G199 A210	G323 A334
R241	
• Une E200 (sitio A)	• Une D267 (sitio B)

En la Figura 7 se muestra la estructura de la RI Δ 1-91 donde se pueden ubicar los aminoácidos antes mencionados.

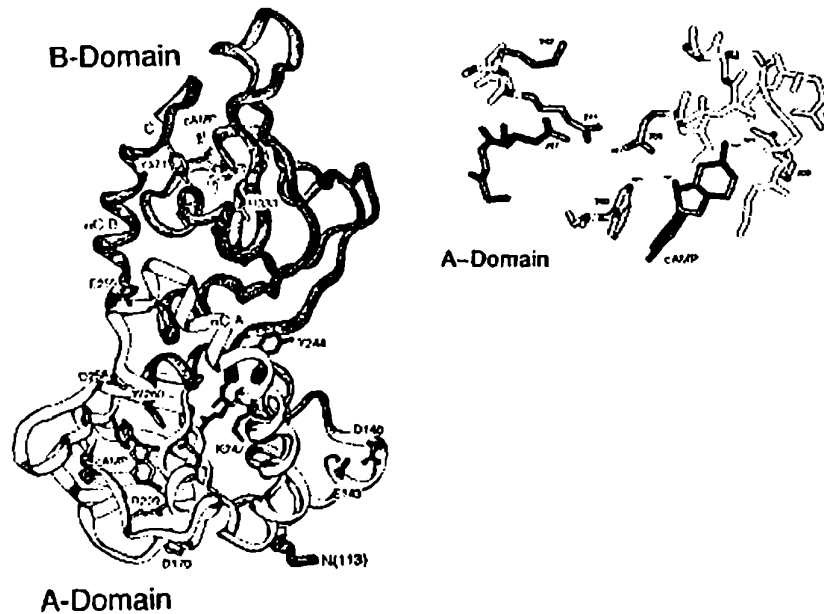


Figura 7- Estructura de los dominios de unión a cAMP en RI Δ 1-91 y detalle de los aminoácidos que participan en la unión del nucleótido cíclico y en su estabilización.

Inhibidor termoestable de la PK A (PKI)

Además de la inhibición reversible de la actividad catalítica de la subunidad C por R, existe, en eucariontes superiores, una inhibición por la proteína inhibidora termoestable, PKI (Walsh *et al*, 1971). Es de notar que no se ha encontrado una proteína similar en eucariontes inferiores.

Mediante diversos abordajes se ha demostrado que este inhibidor no se une ni a la holoenzima ni a la R libre, y que compite con ésta por la unión a C compartiendo, al menos en parte, el mismo sitio de unión en la subunidad C. La afinidad de la subunidad R por C es de aproximadamente 2 a 5 veces superior que la que presenta el PKI por C, a pesar de que no se ha hecho la comparación en idénticas condiciones. Bajo estas circunstancias sería de esperar que a concentraciones equimolares de todos los componentes (PKI, subunidad C y monómero de R) la subunidad C se encontrara mayoritariamente asociada a R formando holoenzima, con ausencia o baja formación de complejo PKI-C. A pesar de las diferencias sustanciales a nivel estructural, tanto R como PKI se unen e inactivan C por mecanismos análogos. PKI se une de manera competitiva a C respecto de otros sustratos a través de su secuencia de pseudosustrato (ver más adelante Fig 11).

A pesar de haber sido identificado hace más de 20 años, su función *in vivo* permaneció oscura hasta hace poco tiempo en que se descubrió que juega un rol importante no solo inhibiendo la actividad de C sino restringiendo su acceso al núcleo (Fantozzi *et al*, 1994).

Holoenzima

Composición y características de las isoenzimas

Se asume en general que las subunidades catalíticas se asocian libremente con los homodímeros de todas las subunidades R. Se ha descrito que PK A_I (RI α ₂C₂ y RI β ₂C₂) y PK A_{II} (RII α ₂C₂ y RII β ₂C₂) presentan distintas propiedades bioquímicas. Las holoenzimas que poseen RI β son de 2 a 7 veces más sensibles a los nucleótidos cíclicos que las que están formadas por RI α (Taskén *et al*, 1997). Estudios cinéticos empleando subunidades R humanas recombinantes indican que las diferencias en las constantes de activación (K_{act}) de RI α ₂C₂ y RI β ₂C₂ se deben a una diferencia de 2.8 veces en la afinidad por C, y no a diferencias en la unión de cAMP (Taskén *et al*, 1997). RII α expresada en altos niveles compite con RII β por la unión de C, indicando tanto la posibilidad de una afinidad mayor por C como así también de un umbral mayor para la disociación inducida por cAMP (Otten *et al*, 1991).

La caracterización de una línea celular que carece de RII reveló la presencia de una nueva isoenzima formada por heterodímeros RI α -RI β asociados a actividad fosfotransferasa. Esta holoenzima eluye en la posición de la PK AII en cromatografía de DEAE-celulosa. Existen evidencias preliminares en cuanto a la heterodimerización de isoformas de RII (Taskén *et al*, 1997). De esta manera se incrementa el número potencial de isoenzimas en la célula que añaden la posibilidad de una mayor diversificación de señales mediadas por cAMP.

Expresión diferencial

Las subunidades α (C α , RI α , RII α) de la PK A se expresan en casi todas las células y tejidos (Scott, 1991). Las subunidades β (C β , RI β , RII β) se expresan predominantemente en cerebro y tejidos gonadales (Scott, 1991), aunque se puede demostrar que tienen un muy bajo nivel de expresión en un amplio rango de tejidos humanos (Taskén *et al*, 1997). La expresión de C γ ha sido demostrada sólo en testículo humano (Beebe *et al*, 1990).

Los niveles de expresión de diferentes subunidades de PK A están sujetos a regulación por hormonas peptídicas y cAMP, así como por glucocorticoides y vitamina D (Taskén *et al*, 1997). La regulación de los niveles de subunidades por hormonas que actúan a través de cAMP puede servir como un mecanismo de sensibilización/ desensibilización del sistema efector del cAMP. Este tipo de regulación actúa a través de alteraciones en la transcripción génica y en la estabilidad del mRNA, como así también a través de la alteración de la estabilidad de las subunidades R y C después de la disociación de la holoenzima provocada por el cAMP (Taskén *et al*, 1997).

Activación y reasociación de la holoenzima

Se ha estimado que el orden de la constante de afinidad entre la subunidad R y C es del décimo de nM y se determinó que el cAMP puede cambiar el equilibrio entre R y C casi 20000 veces llevando así el valor de la constante al orden de μ M.

El cAMP disminuye la afinidad entre R y C por dos mecanismos. Por un lado se cree que se induce un cambio conformacional que afecta a la región "bisagra", la cual ya hemos dicho que es la principal región involucrada en la inhibición de C por R. Por otro lado se postula que se induciría un cambio conformacional de R que alteraría regiones de contacto entre R y C fuera de esta región. También se propone un modelo que sería la combinación de ambos efectos (Døskeland *et al*, 1993)).

Si bien el cAMP induce la disociación de la holoenzima, a concentraciones extremadamente bajas de enzima la PKA se disocia en ausencia de cAMP; por el contrario, a concentraciones muy altas de enzima, la holoenzima persiste aún a concentraciones saturantes de cAMP (Døskeland *et al*, 1993).

La holoenzima de tipo I, une Mg-ATP con alta afinidad y existe en la célula como un complejo ternario conteniendo R, C y Mg-ATP. El Mg-ATP se une 100 veces más fuerte a la PKA que a la subunidad C, por lo tanto estabiliza la holoenzima. El Mg-ADP tiene una afinidad mucho menor por la PKA que por la C, esto significa que el Mg-ADP no va a favorecer la formación de la holoenzima. La reasociación de la subunidad catalítica con la subunidad regulatoria saturada con cAMP ocurre muy lentamente en ausencia de Mg-ATP. Por lo tanto la rápida reasociación de la subunidad catalítica con la subunidad regulatoria y la consecuente liberación de cAMP necesita del complejo binario C-MgATP. En ausencia de Mg-ATP la subunidad catalítica no asume la conformación óptima para que se produzca la liberación de cAMP y se forme la holoenzima.

Se sabe menos de la afinidad por cAMP y por Mg-ATP de la PKA tipo II, y además la autofosforilación hace más complicado el análisis. El cAMP cambia el equilibrio entre R_{II} y C. El Mg-ADP aumenta la reasociación entre P- R_{II} o R_{II} y C, lo cual sugiere que el Mg-ADP tiene mayor afinidad por la holoenzima que por C libre. También se vio que la subunidad C tiene disminuida la afinidad por R fosforilada, en comparación con la R no fosforilada (Rosen & Erlichman, 1975; Hoffmann *et al*, 1975) y que además la forma fosforilada se disocia a una menor concentración de cAMP que la holoenzima defosforilada (Hoffmann *et al*, 1975). La defosforilación podrá ocurrir después que la holoenzima se disocia, cuando la P-Ser se hace accesible a las fosfatasas; por lo tanto en el caso de la PKA tipo II, en teoría, la reasociación se vería facilitada por la participación de fosfatasas (Taylor *et al*, 1990).

Análisis de la interacción R/C

Los dos inhibidores fisiológicos de la subunidad C, el inhibidor termoestable (PKI) y la subunidad regulatoria (R) se unen a C con alta afinidad, con valores de K_d en el rango subnanomolar, mientras que péptidos conteniendo solo la secuencia consenso RRXS, se unen con una afinidad en el orden micromolar. Cabe destacar que todavía no ha sido cristalizada la holoenzima, por lo cual los detalles moleculares de la interacción R/C no se conocen aún y los modelos postulados se basan en la información obtenida por experimentos genéticos o bioquímicos. En el apéndice final de esta Tesis se puede acceder a una recopilación que se hizo de las conclusiones estructurales derivadas de los principales trabajos en los que se realizaron mutaciones en las subunidades R_I y R_{II} y se estudiaron las consecuencias en su interacción con C. En el mismo apéndice se encuentra un alineamiento múltiple de varias secuencias de subunidades R y C clonadas, incluyendo fundamentalmente a las de hongos, de algunos otros eucariontes inferiores como así también secuencias de eucariontes superiores. A continuación se resumen las observaciones y conclusiones más importantes obtenidas respecto a la interacción de ambas subunidades.

Son muchas las evidencias que indican que la subunidad C posee regiones adicionales de interacción con R y PKI que se ubican fuera del sitio de reconocimiento de la secuencia consenso de sustratos (IRS). Se ha demostrado que una variante mutada de R_{II} de mamífero, en la cual ambas argininas del sitio de autofosforilación fueron reemplazadas por alaninas, sigue siendo capaz de formar un complejo estable con la subunidad C (Wang *et al*, 1991). Es de notar que sustituciones equivalentes en un sustrato peptídico reducen la especificidad (V_{max}/K_m) 1.10^8 veces. Estas regiones adicionales de interacción han sido denominadas "sitios de reconocimiento periféricos" (PRS). (Figura 8).

PRS1 es esencial para el reconocimiento del PKI mientras que PRS2 es crítico para las subunidades R. El sitio PRS1 ha sido definido en la estructura cristalina del complejo formado por la subunidad C y el péptido inhibidor, PKI (5-24)

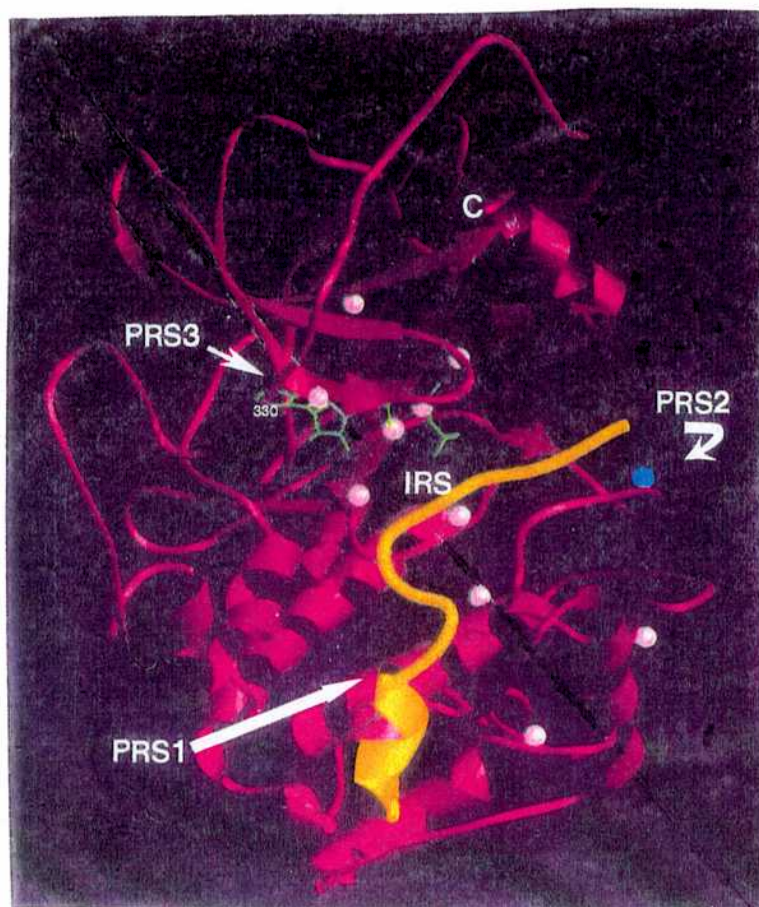


Figura 8-Posición de los sitios de reconocimiento periférico (PRS) en C. Estructura cristalina de la subunidad C unida al PKI(5-24) (amarillo y a MgATP (verde). Los residuos conservados aparecen como esferas blancas. P-Thr 197, localizada en el PRS2 está indicada en azul.

En contraste con las superficies ácidas de los sitios IRS y PRS1, la superficie de PRS2 importante para la unión de R es muy básica, incluyendo His87, Lys189, Lys213, Arg194 y Lys217, que circundan la fosfotreonina 197 cargada negativamente en el loop de activación. Mutaciones en esta superficie generan proteínas cuya regulación por R es defectiva, mientras que no interfieren con la unión al PKI. Cabe destacar que los sitios correspondientes a K189, K213 y K217 en la subunidad Tpk1 de levadura fueron identificados como importantes en la relación R/C (Gibbs *et al*, 1992) , pero que mutados en la subunidad C de mamíferos solo K213 y K217 fueron defectivos en la formación de holoenzima siendo más severa la mutación en K213 (Gibson *et al*, 1997). A pesar de que estas proteínas son 40% homólogas las interacciones moleculares precisas entre Tpk1 y Bcy1 en levaduras y C $_{\alpha}$ con R $_i$ en mamíferos,

son evidentemente distintas. La interacción R/C en levaduras es dos órdenes de magnitud más débil que entre las subunidades de mamíferos ($K_d = 20 \text{ nM}$ vs $K_d = 0.2 \text{ nM}$). En el caso de la subunidad C de levadura la afinidad por el kémptido o por un péptido derivado de un sustrato natural [ADR1 (217-234)] es 20-30 veces menor que en el caso de mamíferos (Zoller *et al*, 1988; Denis *et al*, 1991). Otra diferencia importante entre estas subunidades es que la subunidad de levadura es inhibida por PKI con baja potencia (Glass *et al*, 1992).

Estructura cuaternaria de la holoenzima

La mejor aproximación actual al modelo de holoenzima ha sido presentada por Zhao y sus colegas, quienes estudiaron la estructura de C y R como componentes del dímero $\Delta^{1-90}\text{RII}_\alpha\text{C}_\alpha$ murino ó $\Delta^{1-90}\text{RII}_\alpha$ de corazón bovino mediante la técnica de dispersión de neutrones (Zhao *et al*, 1998). A continuación se describen las principales observaciones que se desprenden de este estudio, que están volcadas en el modelo de la Figura 9.

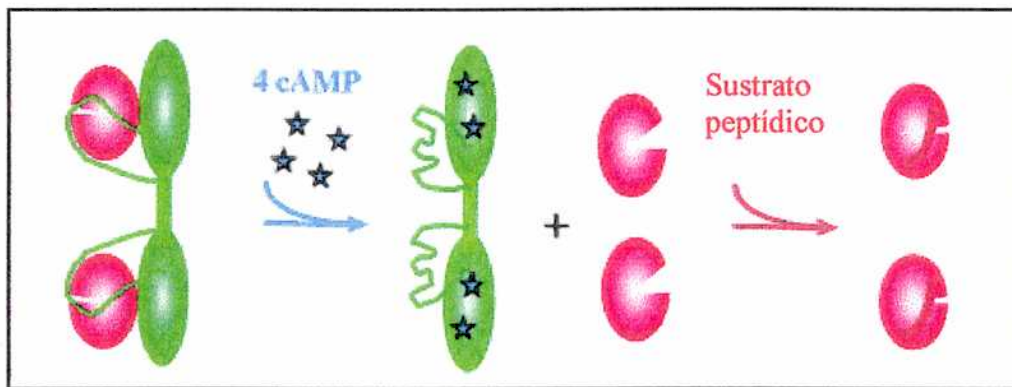


Figura 9-Modelo de activación de la PK A teniendo en cuenta las conformaciones cerrada y abierta de la subunidad C.

Estructura de C como componente del dímero R-C

La unión de R a C provoca los mismos cambios conformacionales en C que la unión del péptido derivado de PKI (Olah *et al*, 1993; Zheng *et al*, 1993), esto implica que la zona del surco entre lóbulos en C cambia de una conformación “abierta” a una “cerrada” al unir cualquiera de sus inhibidores.

Estructura de R libre, unida a cAMP o como componente del dímero R-C

No se observaron cambios conformacionales en $\Delta^{1-90}\text{RII}_\alpha$ después de la adición de cAMP. Esta R presenta una estructura más extendida al unirse a C. Esto podría esperarse si

la secuencia pseudosustrato se extendiese de los sitios de unión a cAMP para introducirse en el surco catalítico de C.

Modelo de estructura cuaternaria de la holoenzima

En la Figura 10 se muestra el modelo de estructura cuaternaria de la holoenzima

Los datos utilizados para armar este modelo fueron:

-modelos elipsoidales obtenidos mediante simulación por Monte Carlo de los datos obtenidos por técnicas basadas en dispersión de neutrones

-estructuras cristalinas de $\Delta^{1-91}\text{RI}_\alpha$ -cAMP (consideraciones: RI y RII tienen alta homología a partir de la secuencia consenso; en $\Delta^{1-91}\text{RII}_\alpha$ la unión de cAMP no provoca cambios conformacionales) y de C unida a PKI α -(5-24).

-para definir la correcta orientación rotacional de cada subunidad se tuvieron en cuenta los estudios de mutaciones tanto en PK A de mamíferos como de levaduras.

-residuos importantes en la interacción R/C (numeración PKA mamíferos):

en C	en R
<u>alejados del sitio catalítico</u>	
Trp196	Glu105
Thr197	Asp140
Leu198	Glu143
Lys213	Asp170
Lys217	Lys242
	Asp258
<u>mutaciones compensadas</u>	
Lys213 ←	→ Glu143
<u>sitio catalítico</u>	
His87	Ser99 RI α murina (mutación complem) (Cys98 RII α murina x homología RI α) Arg93, Arg94, Val97 (por homología con Arg18, Arg19, Ile22 en PKI)

-y por último, los aminoácidos identificados como NO involucrados en la interacción R/C, que surgen de Gibbs *et al*, 1992, en levaduras.

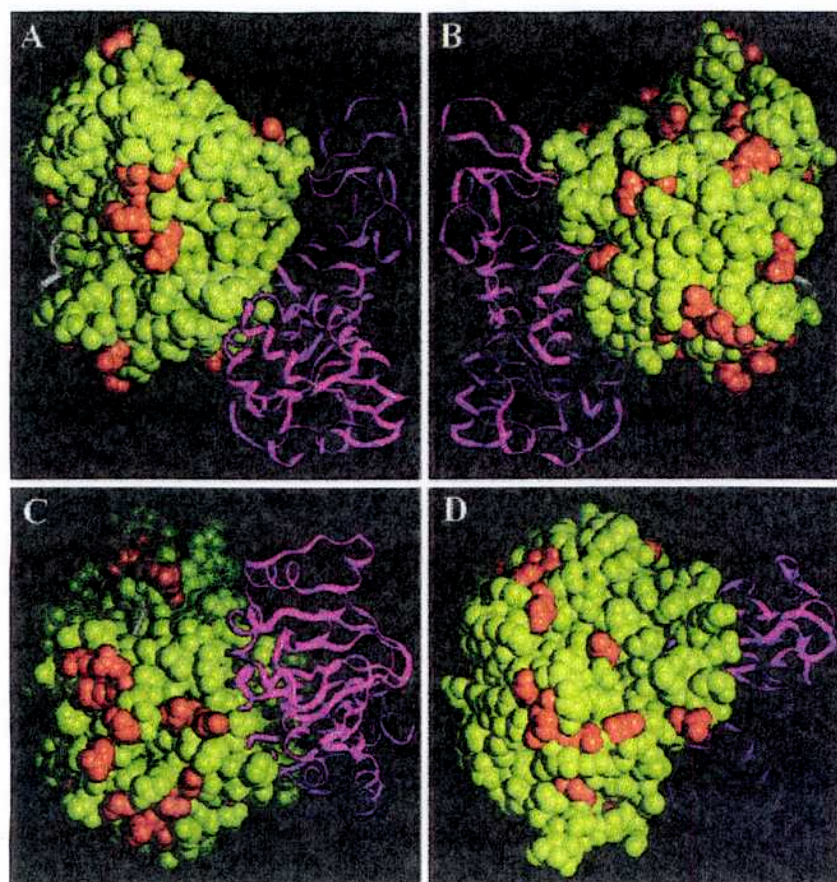


Figura 10- Sitios de interacción R-C, mapeo de la subunidad C. La subunidad C se presenta como modelo CPK en verde y naranja mientras que la subunidad R aparece como modelo de cinta violeta. El panel B muestra una vista de A rotada 180° alrededor del eje y, el panel C presenta una rotación horaria de la imagen en A, de 90° sobre el eje x, el panel D muestra una rotación antihoraria de la imagen A, de 90° sobre su eje x. Los residuos en naranja de la subunidad C fueron indicados como probablemente no involucrados en la interacción R-C en los estudios de barrido de mutaciones (scanning mutagénesis, Gibbs & Zoller, 1991; Gibbs *et al*, 1992) llevados a cabo en la PK A de levadura. Aquí se han marcado los residuos equivalentes en la PK A de mamíferos: Thr³², Thr³⁷, Gln⁴², Lys⁶¹, Lys⁶³, Gln⁷⁷, Lys⁸¹, Lys⁸³, Asn⁹⁰, Lys¹⁰⁵, Asp¹¹², Arg¹³⁷, Gln¹⁷⁶, Gln²⁴⁵, Glu²⁴⁸, Lys²⁴⁹, Lys²⁵⁴, Arg²⁵⁶, Ser²⁶³, Asp²⁶⁴, Lys²⁶⁶, Asp²⁶⁷, Asn²⁷¹, Val²⁷⁵, Asp²⁷⁶, Asn²⁸⁹, Ile³⁰³, Ala³⁰⁴, Glu³¹², Ile³¹⁵, Asp³²⁸ y Glu³⁴³.

Especificidad de sustrato de la PKA

La PKA fosforila muchas proteínas. Aunque los sustratos muestran poca similitud aparente, deben tener alguna estructura en común que es reconocida por el sitio activo de la PKA. Primero se propuso que el común denominador sería una adecuada estructura tridimensional del sustrato (Lanagan, 1973). Pero luego Kemp (Kemp *et al*, 1975) estudiando variantes de la β -caseína, tuvo evidencia de la importancia de la estructura primaria en la región de la Serina fosforilable. Posteriormente se identificó a la piruvato quinasa como sustrato de la PKA y finalmente que un fragmento obtenido con bromuro de cianógeno, de esta enzima, era mejor sustrato aún que la proteína entera (Humble *et al*, 1975). Cuando se

determinó la secuencia de aminoácidos de la piruvato quinasa de hígado porcino y de rata, fue posible sintetizar péptidos que resultaron ser excelentes sustratos, con valores de K_m del orden de la concentración de la piruvato quinasa *in vivo*. Se definió así un heptapéptido con una secuencia consenso que fue sintetizado por Kemp (Kemp *et al*, 1976), este sustrato se denominó kemptido y ahora sirve como sustrato universal para la PKA. La secuencia de este heptapéptido es **Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly**. Haciendo estudios de sustitución de aminoácidos en el kemptido, se demostró la importancia de los residuos arginina ubicados hacia el lado amino de la serina fosforilable (Kemp *et al*, 1977). Cambios en la posición de esas argininas ya sea ubicándolas más próximas o más lejanas de la serina aceptora de fosfato, o la sustitución de estas argininas por lisina hacen que el péptido sea un pobre sustrato de la PKA. Por lo tanto de esto surge que las propiedades cinéticas de sustratos óptimos no soportan alteraciones estructurales de las proteínas sustrato.

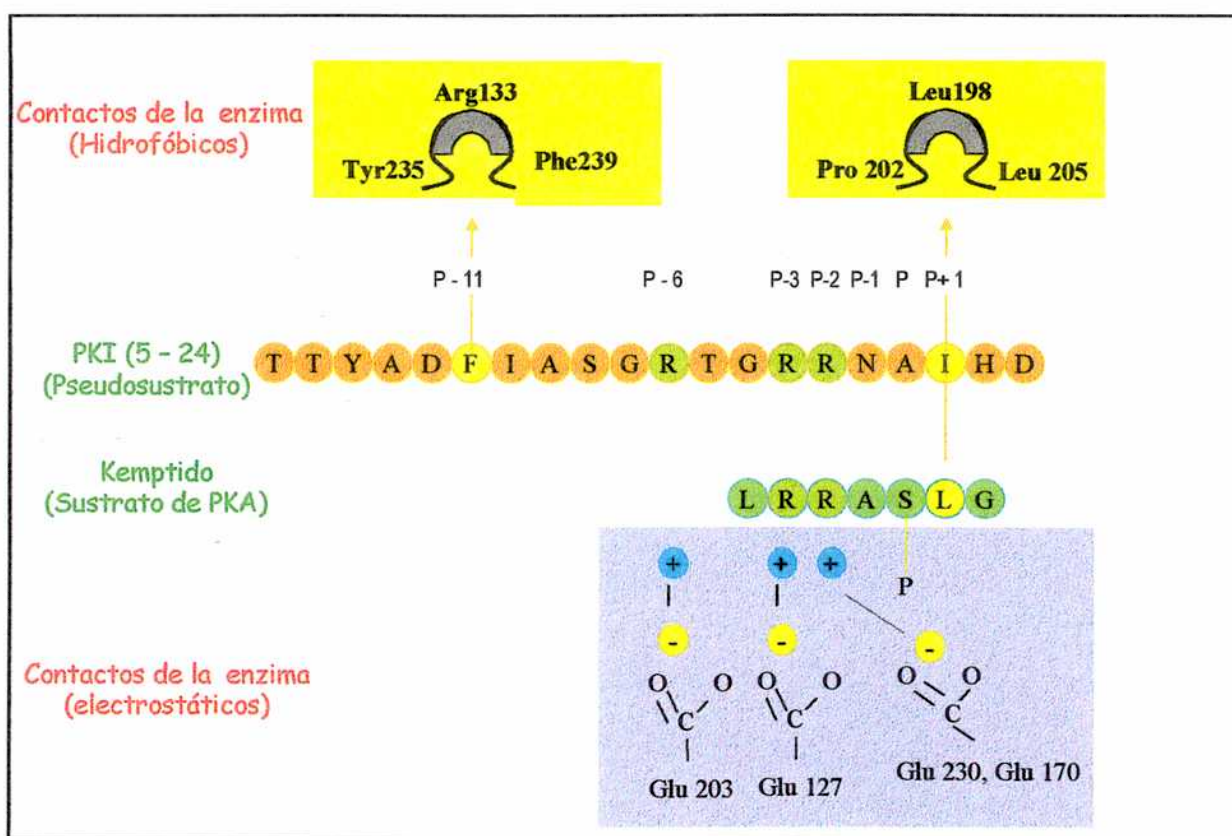


Figura 11-Interacción de PK A con el OPKI y con sustratos. Sitios aceptores hidrofóbicos están en amarillo y sitio aceptor ácido en lila..

Estudios de estructura cristalina de la subunidad C unida al PKI (Figura 3), apoyan la idea que sostiene que la unión a una secuencia específica de aminoácidos es necesaria para una interacción óptima de alta afinidad. Se demostró que la mayoría de los sitios de unión del PKI están ubicados en el lóbulo menor de la subunidad C (Figura 3). Existen residuos ácidos

que son importantes para hacer contactos de tipo electrostáticos con los residuos arginina del PKI. También se identificaron interacciones no electrostáticas entre el PKI y la C. Se determinó que residuos hidrofóbicos ubicados a ambos lados de la serina fosforilable (P^{+1} y P^{-11}) se unirían a un bolsillo ubicado en el lóbulo menor. Por inferencia se postulan estos sitios de contacto para las proteínas sustrato (Knighton *et al*, 1991) (Figura 11).

De todo esto surge que hay un grupo de interacciones específicas que son esenciales para la unión óptima de una proteína sustrato a la quinasa. Desviaciones de esa secuencia óptima claramente afectan la posibilidad de las proteínas sustrato de interactuar con el sitio catalítico de la quinasa. Sin embargo analizando los sitios de fosforilación de los sustratos naturales de la PKA, se encuentra que muchos de estos no tienen la secuencia óptima esperada, *Arg-Arg-X-Ser*, sino que presentan secuencias que difieren de ésta. En la Tabla 2 están agrupados los sustratos encontrados para PKA. Se puede apreciar que no todos poseen la secuencia consenso ***Arg-Arg-X-Ser***.

Sustituciones en las argininas clave por lisinas o cambios en la ubicación de estos residuos con respecto a la serina fosforilable, dos situaciones que producen efectos drásticos en la capacidad de un péptido de ser sustrato de PKA *in vitro*, son fenómenos comunes en los sustratos naturales. La sustitución de un residuo hidrofóbico ubicado inmediato a la serina fosforilable del lado carboxilo, es también pobremente tolerado en los péptidos ensayados *in vitro*; sin embargo es otra variación común encontrada en los sustratos naturales.

Esta flexibilidad en la secuencia de los sustratos sugiere que éstos presentan una amplia variedad de afinidades por la quinasa. Los sustratos de una enzima que tiene múltiples sustratos, como es el caso de la quinasa, compiten por la interacción con la enzima; al tener distintas afinidades por la subunidad C, y ser por lo tanto mejores o peores sustratos para la fosforilación se puede producir un orden temporal en la fosforilación. Por lo tanto la variación de secuencias de los sitios de fosforilación de los sustratos de PKA pueden ser la base del orden en las fosforilaciones.

Los sustratos con diferentes secuencias que rodean el sitio de fosforilación no sólo tendrían afinidades diferentes por la quinasa sino también podrían influir en el proceso intrínseco de catálisis, ya que las diferencias en la unión de los sustratos podría reflejarse en diferencias en la unión de los productos fosforilados. Esto último es un paso limitante de la velocidad del proceso de catálisis (Adams & Taylor, 1993). Todo esto llevaría a diferentes velocidades de fosforilación, lo cual sería importante en la dinámica de la transducción de la señal, indicando el orden de los eventos de la fosforilación de las proteínas dentro de la célula.

Tabla 2: Sustratos de PKA que están presentes en mayor concentración en la célula

Glucógeno sintetasa de músculo (1a)	RNIRAPQWPRRASCT
Fosforilasa quinasa 1α	KSEIKQVEFRRLSIS
Proteína fosfatasa 1	KPGFSPQPSRRGSES
Piruvato quinasa de hígado de cerdo	EGPAGYLRRASLA
CREB de cerebro de rata	SQKRREILSRRPSYR
Tirosina hidroxilasa de hígado	AVTSPRFIGRRQSLI
Subunidad R _{II} de PKA	DVPIPGRFDRRV SVC
Fosfolamban	VQYLTRSAIRRASTI
Receptor de acetil colina γ	PDWQNDLKLRRSSSV
Pro-ANP	GPRSLRRSSSCF
Inhibidor I de proteína fosfatasa	PEAAEQIRRRRTSPA
PFK\ fructosa bifosfatasa	SSSSSVLQRRRGSSI
Proteína ribosomal S ₆	KRQEQIAKRRRLSSL
Troponina de corazón de conejo	AGEAKPAPAVRRSDR
Lipasa hormona sensible	HGFWALTESMRRSVS
PFK	EHAHLEHISRKRSGE
Fenilalanina hidroxilasa	VVLGNGVLSRKLSDF
MLCK	TGHAVRAIGRLSSMA
Fructosa bifosfatasa	EIYNKDKAKSRPSLP
Fosforilasa quinasa β	VLERRARTKRSGSVY
Glucógeno sintetasa de músculo (1b)	CTSSSGGSKRSNSVD
Glucógeno sintetasa de Músculo (2)	PLSRTL SVS
Carboxilasa Acetil CoA	SALQDGLAFHMRSSM
ATP Citrato Liasa	GSTSTPAPSRTASFS
Subunidad Catalítica de PKA (Ser 338)	NFDDYEEEEIRV SIN

Para considerar una proteína como sustrato de la PKA se debe cumplir que su fosforilación *in vivo* debe surgir en respuesta a un incremento en el cAMP, inducido por un estímulo, y que el sitio donde se fosforila sea el mismo que se fosforila por PKA *in vitro*. Las propiedades funcionales de la proteína deberán sufrir cambios que correlacionen con el grado de fosforilación y éste debe correlacionar con el nivel celular de cAMP. Un importante indicio de que la fosforilación tendría significancia fisiológica sería que la reacción de fosforilación tuviera una K_m aparente del orden de su concentración *in vivo* (Krebs & Beavo, 1979).

Se puede afirmar entonces que varios parámetros dentro de la célula pueden afectar la eficiencia con que las proteínas son utilizadas como sustratos de la PKA. Estos pueden ser categorizados en tres grupos: 1) la localización celular de la quinasa relativa a la proteína sustrato candidata, 2) las características inherentes a la estructura de los sustratos, y 3) las características de las estructuras de las proteínas sustratos que son una consecuencia de interacciones alostéricas o modificaciones covalentes.

1) La distribución celular de la PKA no es al azar. Ya han sido mencionadas anteriormente las AKAPs, un grupo de proteínas que se encuentran asociadas a la subunidad R_{II} , manteniendo la PKA en zonas subcelulares específicas. De esta manera proteínas unidas a la PKA o cercanas a su sitio de anclaje serán blancos preferenciales para fosforilación.

Ha tomado importancia la idea del transporte de la PKA o de sus subunidades a sitios subcelulares específicos, al comprobarse que el PKI podría actuar secuestrando C. El PKI actuaría no sólo inhibiendo a la quinasa sino también intervendría en la localización subcelular de C en presencia de cAMP impidiendo su entrada al núcleo o favoreciendo su salida del mismo (Fantozzi *et al*, 1994).

La ubicación y el transporte específico de la PKA dentro de la célula pueden servir como mecanismos para dar un cierto orden a la fosforilación de los sustratos.

2) Este punto ya ha sido discutido anteriormente pero podemos decir resumidamente que la secuencia de aminoácidos que rodea a la serina blanco de fosforilación afecta su posibilidad de ser fosforilado por la PKA. Esto está influido también por la estructura terciaria de la proteína. El orden en que son fosforilados los sustratos de una quinasa que posee múltiples sustratos depende en parte de la eficacia de esa proteína de ser sustrato. Así las proteínas se han diversificado y desarrollado para ser mejores o peores sustratos de fosforilación de una determinada quinasa.

3) Una proteína tiene un potencial de ser sustrato que está determinado por la estructura inherente de la proteína; modificaciones en la estructura de esa proteína pueden alterar ese potencial. Modificaciones covalentes como las fosforilaciones inducen cambios conformacionales en las proteínas, que regulan su habilidad de servir a su vez como sustrato de fosforilación. También pueden ocurrir cambios conformacionales en las proteínas por modificaciones no covalentes, como puede ser la interacción con moduladores alostéricos.

De esta manera se regularía la elección de los sustratos y el orden en el cual estos serán fosforilados por la PKA.

Control de la síntesis y de la degradación de la subunidades de PKA

Dado que las isoenzimas tiene diferentes roles biológicos es importante que la concentración relativa de ellas esté regulada, lo cual es necesario para optimizar la señalización por cAMP cuando la célula pasa de un estado fisiológico a otro.

Primero se pensaba que PKA I y PKA II, estaban diferencialmente expresadas en los tejidos, sin una correlación clara con la función del tejido (Corbin *et al*, 1975). Luego se determinó que en tejidos sexuales dependientes de esteroides, el incremento en la expresión de R_i , correlacionaba positivamente con el crecimiento inducido por la hormona, lo cual llevó a la hipótesis que la PKA I era promotora de crecimiento (Russel, 1978). Una explicación mas razonable sería que el gen de $R_{i\alpha}$ responde generalmente más rápido que el gen para $R_{i\alpha}$ a la demanda de un incremento en la síntesis de R, como cuando los tejidos crecen rápidamente en respuesta a hormonas, regeneración o realimentación (Russel, 1978; Ekanger *et al*, 1990).

El cAMP mismo , influye sobre la expresión de PKA. Se ha visto que el cAMP induce $R_{i\alpha}$ y $R_{i\beta}$ en distintas líneas celulares (Gross & Rubin, 1990; Landmark *et al*, 1991) En respuesta a altos niveles de cAMP puede ocurrir una regulación negativa de la actividad de PKA, como consecuencia de una disminución en los niveles de subunidad C, presumiblemente por la acción de una proteasa con eficiencia particular por la subunidad C libre (Alhanaty & Shaltiel, 1979). La regulación negativa de la PKA también se puede alcanzar por un aumento en los niveles de la subunidad R, relativos a C (Ekanger *et al*, 1990; Houge *et al*, 1990). Se encontró una secuencia consenso de respuesta a cAMP en el promotor de $R_{i\alpha}$, que podría explicar la transcripción estimulada por cAMP (Taskén *et al*, 1991) de esta subunidad. Aunque se ha demostrado la estabilización de R_i por cAMP (Jackiw & Hunzicker-Dunn, 1992) es más común que el cAMP promueva la degradación de R por proteólisis diferencial de la R libre después de su disociación de C (Steimberg & Agard, 1981). El cAMP puede aumentar los mRNA de $R_{i\beta}$, por activación transcripcional y por estabilización del mRNA ((Taskén *et al*, 1991; Gross & Rubin, 1990).

Estudio del mecanismo de activación de la PK A.

Estudios de la regulación de la actividad PK A por cAMP han demostrado que la holoenzima se disocia, usando técnicas de no-equilibrio. Sin embargo se ha planteado la duda de si *in vivo* la activación de la holoenzima por cAMP implica necesariamente disociación. Existen evidencias que favorecen esta idea:

- La concentración de enzima usada en ensayos *in vitro* está en el orden de subnanomolar mientras que la concentración celular típica se encuentra alrededor de 0.2-2 μM (Francis & Corbin, 1994). Esta diferencia de dos o más órdenes de magnitud en la concentración de holoenzima afecta de igual forma la constante de activación de la misma por cAMP. Por lo tanto, teniendo en cuenta la constante de disociación de la holoenzima de mamíferos con cAMP unido y la concentración de PK A intracelular (Doskeland *et al*, 1993), puede existir holoenzima saturada con cAMP dentro de la célula.
- Aún *in vitro* se han aislado complejos ternarios $\text{R}_2\text{C}_2\text{cAMP}_x$ (Moreno *et al*, 1983; Connelly *et al*, 1986).
- Se ha sugerido que la PK A saturada con cAMP podría retener parte de la actividad quinasa de la subunidad C libre en analogía con la quinasa no disociable dependiente de cGMP (PK G), siendo posible que el complejo ternario y la subunidad C libre tuviesen distinta especificidad de sustrato.
- Han sido presentadas por Yang *et al* (Yang *et al*, 1995) evidencias de que el cAMP induce actividad de la holoenzima sin disociación de sus subunidades sugiriendo que la unión del cAMP a la PK A es insuficiente para explicar su disociación *in vivo*

De acuerdo con el modelo de activación / disociación, siempre es la subunidad C libre la que es capaz de distinguir entre sustratos diferentes para fosforilar los adecuados. Sin embargo, se necesitan modelos más complejos que expliquen los eventos de fosforilación específicos que ocurren luego de la activación de un tipo de holoenzima particular, o para explicar la variedad de respuestas que es capaz de desarrollar un mismo sistema como consecuencia de la acción de distintas drogas que se conoce que actúan activando el mismo camino mediado por cAMP (Cho-Chung & Clair, 1993; Walsh & Patten, 1994; Taskén *et al*, 1997)

La fuente de variabilidad para la regulación selectiva de diferentes eventos de fosforilación mediados por PK A puede ser explicada teniendo en cuenta la afinidad de las distintas isoenzimas de R por el cAMP y por C, la concentración de sustratos, la localización subcelular de las diferentes isoformas, la interrelación con otros caminos de transducción de señales y el reconocimiento diferencial de sustratos por parte de las distintas isoenzimas de C.

Una holoenzima con cAMP unido capaz de ser activa podría añadir un nivel interesante de diversidad para explicar el comportamiento de la PK A *in vivo*.

El principal objetivo de esta Tesis fue el de tratar de entender el mecanismo molecular que lleva a la activación de la PK A *in vivo*, a través de dos enfoques totalmente distintos.

e

Línea 1: Participación del sustrato proteico en el mecanismo de activación de la PK A.

Hipótesis

El cAMP no es el único factor necesario para la activación de PK A, *in vivo*; otros componentes tales como el sustrato proteico y los policationes participan en este proceso.

Objetivo

Estudio de la participación del sustrato proteico en el mecanismo de activación de la PK A., utilizando PK A de *Mucor rouxii*.

Antecedentes

Quinasa de proteínas dependiente de cAMP de *Mucor rouxii*

La quinasa de proteínas dependiente de cAMP del hongo dimórfico *Mucor rouxii* es una enzima tetramérica, R_2C_2 , con un peso molecular de 240 kD; cada subunidad C tiene un peso molecular de 40kD y cada subunidad R tiene un peso molecular de 75 kD, siendo éste inusualmente grande entre las subunidades R de PK A (Pastori *et al.*, 1985).

Se determinó la existencia de dos sitios de unión de cAMP por monómero de subunidad regulatoria, como en la de los eucariontes superiores, existiendo cooperatividad positiva entre ellos. También como en la enzima de mamíferos hay sinergismo en la activación de la enzima por análogos específicos de uno y otro sitio (Paveto *et al.*, 1989). Se ha observado que la subunidad R de la PKA sufre autofosforilación; esto produce una disminución en la interacción entre R y C, favoreciendo el proceso de activación y disociación por cAMP (Rossi *et al.*, 1992).

Se ha descrito que esta quinasa de proteínas presenta la propiedad inusual, de no ser disociada por cAMP solo (Moreno & Passeron, 1980). Por incubación de la holoenzima con cAMP se forma un complejo ternario R_2C_2 -cAMP₂ (Pastori *et al.*, 1981), en el cual el cAMP se une sólo al sitio B (Paveto *et al.*, 1989).). La disociación de la enzima se logra cuando se agrega NaCl, histona o protamina junto con el cAMP (Moreno & Passeron, 1980; Pastori *et al.*, 1981); es bajo esas condiciones que los cuatro sitios de unión a cAMP se encuentran ocupados (Paveto *et al.*, 1989). Esta característica hace que esta enzima sea un buen sistema para el estudio del mecanismo de activación ya que la interacción entre las subunidades R y C en presencia de cAMP se mantiene en condiciones en que otras PK As se disocian. Esta diferencia probablemente sea debido a una mayor afinidad entre las subunidades R y C de *M.rouxii*.

Se estudió también la influencia del sustrato proteico en la disociación de la PKA por cAMP y se observó que la activación por sustratos básicos como protamina e histona era mayor que por el heptapéptido sintético kemptido. Se encontró además que los policationes: polilisina, histonas y poliaminas, producen estimulación en la activación de esta enzima por cAMP cuando se usa kemptido como sustrato. Se postuló, a partir de estos resultados, que la presencia de dominios básicos en el sustrato proteico o la presencia de poliaminas tiene gran importancia en la activación de la quinasa de proteínas de *M.rouxii* (Guthmann *et al.*, 1990) por cAMP.

Constantes cinéticas para la fosforilación de péptidos por la subunidad catalítica de la PK A de *Mucor rouxii*

Con el objeto de establecer la especificidad de sustrato para la PK A de *Mucor rouxii* se determinaron los parámetros cinéticos para 16 péptidos sintéticos y protamina usando la subunidad C libre de *M.rouxii* semipurificada. Los experimentos se llevaron a cabo usando péptidos basados en la secuencia RRXSX, la cual es la mínima secuencia consenso requerida para una eficiente fosforilación por PK A (Kennelly & Krebs, 1991). Algunos de estos péptidos ya han sido usados para estudiar la especificidad de sitio de la PK A de mamíferos (Donella-Deana *et al*, 1993).

Las constantes cinéticas para la fosforilación de péptidos por C_{Mr} se presentan en la Tabla 3. Las velocidades máximas ($V_{m\acute{a}x}$) están expresadas relativas a la $V_{m\acute{a}x}$ del péptido RRASVA tomada como 100%, ya que los péptidos usados han sido diseñados para detectar aquellos cambios que modifiquen la eficiencia de esta secuencia consenso básica. El cambio de serina por treonina (péptidos 1 y 13) o la presencia de prolinas a ambos lados de la serina (péptido 11) anulan la fosforilación. El reemplazo de la valina C-terminal por ácido glutámico (péptido 6) produce una importante disminución en la constante de especificidad como resultado de un considerable incremento del valor de la K_m , mientras que el reemplazo por fenilalanina (péptido 3) aumenta tanto la $V_{m\acute{a}x}$ como la K_m sin modificar de esta manera la eficiencia.

La presencia de por lo menos dos argininas adyacentes y su distancia del residuo serina son críticos para la especificidad de la enzima. Por lo tanto, el cambio de cualquiera de las argininas por alanina o el corrimiento de éstas un residuo más cerca o uno más lejos de la serina anula casi por completo la fosforilación por la enzima (péptidos 8 y 14).

La adición de una alanina en el residuo N-terminal del péptido RRASVA aumentó la constante de especificidad 3 veces (péptido 2). La presencia de una arginina adicional favorece la fosforilación. Esto puede observarse al cambiar la alanina N-terminal del péptido ARRASVA por arginina donde la eficiencia de fosforilación aumenta alrededor de un 50% (péptido 4 versus péptido 2). La adición de una cuarta arginina en el extremo N-terminal (péptido 5) incrementa la constante de especificidad 3 veces más, como resultado de una K_m menor y una $V_{m\acute{a}x}$ superior. El corrimiento de las cuatro argininas consecutivas un residuo más alejado de la serina o el cambio de éstas por 4 lisinas afecta de manera drástica la eficiencia de fosforilación (péptidos 9 y 7).

TABLA 3- Constantes cinéticas para la fosforilación de péptidos por la subunidad catalítica de la PK A de *Mucor rouxii*

	Péptido	K _m (μM)	V _{max} ^a	V _{max} /K _m
1	RRASVA	40	100	2.5
2	ARRASVA	20	150	7.5
3	RRASFA	90	180	2.6
4	RRRASVA	15	160	11.0
5	RRRRASVA	5	190	38.0
6	RRASEA	900	100	0.1
7	KKKKASVA	500	40	0.08
8	RRAASVA	1000	40	0.04
9	RRRRAASVA	120	80	0.7
10	RRRRSVA	> 500 ^b	n.d.	
11	RRPSPA	> 1300 ^b	n.d.	
12	ARASVA	> 1000 ^b	n.d.	
13	RRATVA	> 5000 ^b	n.d.	
14	AARRSVA	> 250 ^b	n.d.	
15	LRRASLG (kemptido)	47	180	3.8
16	KRRRLSSLRA (péptido S6)	14	150	10.7
17	protamina	40	160	4.0
18	PKI ₆₋₂₂	Ki: 150 nM		

^a las actividades están expresadas relativas a la obtenida con el péptido RRASVA tomado como 100%.

^b las concentraciones indicadas fueron las más altas ensayadas

^c a la concentración más alta ensayada la actividad fue indetectable (n.d.)

^d El valor de IC₅₀ fue obtenido usando kemptido, R4 o protamina como sustrato a sus respectivas K_m.

n.d.- not detectable

En general el comportamiento de C_{Mf} frente a los distintos sustratos peptídicos fue similar al que presenta la PK A de mamíferos (Donella-Deana *et al*, 1993). El requerimiento de residuos básicos cerca de la serina fosforilable, y su óptima localización fueron casi idénticos. Las principales diferencias radican en que la enzima de *Mucor* no puede utilizar los péptidos RRASFA y RRRRAASVA tan eficientemente como la subunidad de mamíferos y en la falta de fosforilación del péptido RRATVA. El cambio de las 4 argininas consecutivas del péptido 5 por 4 lisinas anula completamente la fosforilación por la subunidad de mamíferos, pero no anula la

fosforilación por C_M , aunque la actividad enzimática disminuye considerablemente (Tabla 3 y Donella-Deana *et al*, 1993).

Es de notar que la K_m para el kemptido en el caso de las PK As de mamíferos es 20-30 veces menor que en el caso de la enzima de *Mucor*. Esta menor afinidad por el kemptido parece ser una característica de enzimas de eucariontes inferiores ya que ha sido observada con las PK As de *S. cerevisiae*, *Trypanosoma cruzi* y *Candida albicans* (Denis *et al*, 1991; Ochatt *et al*, 1993; Zelada *et al*, 1998).

La subunidad catalítica de la PK A de *Mucor* fue inhibida por PKI₆₋₂₂, el péptido inhibidor más potente correspondiente a la porción activa del inhibidor termoestable de la PK A, con un valor de K_i de 150 nM. Este péptido resultó ser cerca de 30 veces menos potente en inhibir C_M respecto de lo observado para la enzima de mamíferos, como ya ha sido descrito previamente para la subunidad C de levadura (Glass *et al*, 1992).

Activación por cAMP y sustrato

Estudios preliminares habían establecido que la linealidad de la actividad de la PK A de *Mucor* con la concentración de enzima estaba restringida cuando se usaba kemptido como sustrato, mientras que ésta se mantenía en un rango de concentración mayor cuando se usaba histona o protamina en el ensayo (Guthmann *et al*, 1990). Nos interesaba estudiar particularmente el comportamiento de la PK A a aquellas concentraciones donde la diferencia entre un sustrato peptídico y una proteína básica eran evidentes ya que interpretamos que la falta de proporcionalidad se debe a activación incompleta. En el marco de esta Tesis se ha extendido el análisis del mecanismo de activación de la PK A mediante el uso de varios sustratos peptídicos. Se seleccionaron tres sustratos de los mostrados en la Tabla 3 para ser usados en ensayos de quinasa a concentraciones variables de enzima: RRRRASVA (R4) (péptido 5), S6 (péptido 16) y kemptido (K) (péptido 15). Se usó protamina (sustrato 17) como referencia, ya que con este sustrato la enzima es capaz de desarrollar su máxima actividad.

Para analizar la dependencia de la actividad de la holoenzima con la concentración de enzima para los distintos sustratos, los ensayos se hicieron en presencia de cAMP 10 μ M en un rango de concentración de enzima de 0.2-3 nM. La concentración de enzima se estimó teniendo en cuenta los datos de actividad ligante de [3 H]cAMP de las muestras utilizadas y la relación R/C para la enzima de *Mucor* previamente reportada (Rossi & Moreno, 1994). Cada sustrato fue usado a una

concentración de tres veces su K_m , ya que ésta representa una concentración saturante para la subunidad C_{Mr} libre. Como se muestra en la Figura 12 el rango de linealidad para la concentración de enzima cuando se usa protamina como sustrato (Fig 12 inserto) es mucho mayor que en el caso de los sustratos peptídicos.

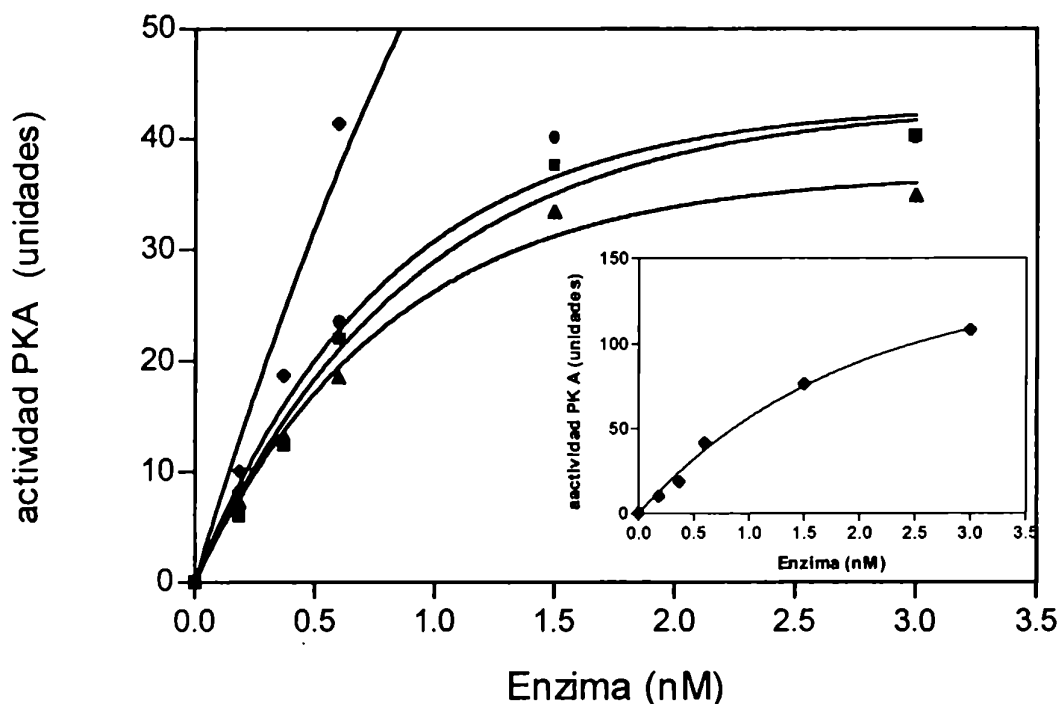


Figura 12-Dependencia de la actividad con la concentración de holoenzima y el sustrato peptídico. Se incubaron diferentes alícuotas de PK A de *Mucor* parcialmente purificada (ver M&M) bajo las condiciones habituales de ensayo, en presencia de cAMP 10 μ M. Las concentraciones de los sustratos, correspondientes a 3 veces sus K_m fueron las siguientes: protamina (◆) 120 μ M; péptido S6 (●) 45 μ M; péptido R4 (■) 15 μ M; kemptido (▲) 150 μ M. El inserto muestra la actividad con protamina en el rango completo de concentración de enzima. Se muestra un experimento tipo representativo de tres, hechos con preparaciones enzimáticas independientes.

Para ensayar el efecto que tiene la variación de la concentración de cAMP sobre la actividad de PK A_{Mr} frente a los sustratos seleccionados se eligió una concentración de enzima donde la falta de proporcionalidad fuese evidente con kemptido y cAMP 10 μ M,

La Figura 13 ilustra la activación de la holoenzima por cAMP para los cuatro sustratos: R4, S6 kemptido y protamina. Cabe recordar que los valores de V_{max} para estos cuatro sustratos usando C libre se encuentran dentro del mismo rango (ver Tabla 3). La concentración de cAMP varió de 25 nM a 1 mM. La activación de la enzima con protamina alcanzó un plateau a cAMP 10 μ M. La disminución de actividad a cAMP 100 μ M y 1 mM es aparente, debido a la inhibición competitiva del ATP por el

cAMP en el ensayo de quinasa. Existen antecedentes de este fenómeno en otros sistemas y evaluado con C_{Mr} libre se vio que es independiente del sustrato.

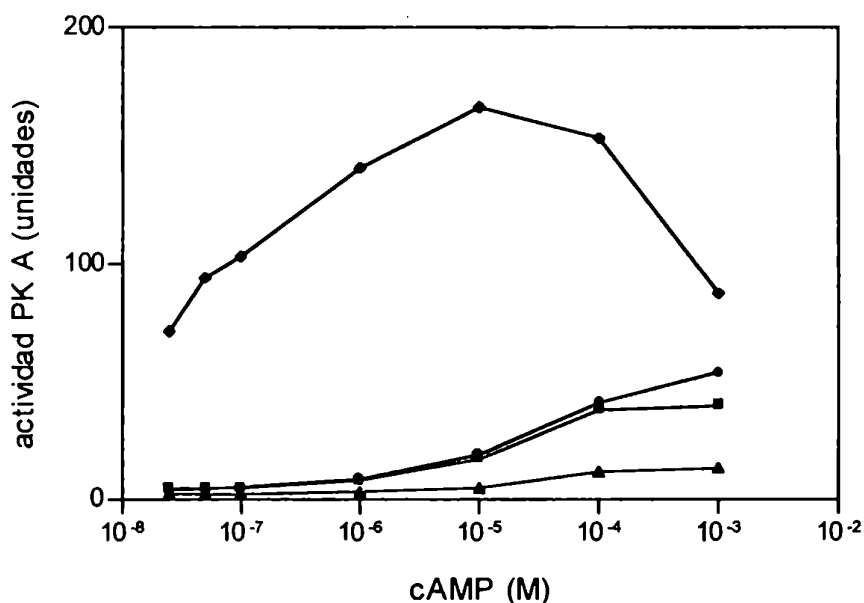


Figura 13- Dependencia de la activación por cAMP con el sustrato. Los ensayos para la medición de actividad quinasa se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones descritas para la Figura 1. Los símbolos son los mismos que los de la Figura 1. Este es un experimento tipo representativo usando una concentración de holoenzima de 3 nM. Para concentraciones mayores a 2 nM el aspecto general de las curvas es el mismo si bien los datos cuantitativos difieren. Se muestra un experimento tipo representativo de tres, hechos con preparaciones enzimáticas independientes.

A diferencia de lo que ocurre con protamina, la actividad quinasa continúa incrementándose en el caso de los sustratos peptídicos a medida que aumenta la concentración de cAMP y no llega a saturación a cAMP 1mM. A esta concentración, la inhibición por cAMP, evidente con protamina, dificulta la interpretación de los resultados ya que en el caso de los péptidos están ocurriendo dos eventos simultáneamente: activación de la holoenzima más el efecto no deseado de la inhibición sobre la actividad catalítica; mientras que en el caso de la protamina la activación es completa y solo se observa el efecto inhibitorio del cAMP. Como consecuencia, y dado que en el caso de los péptidos la enzima está lejos de su máxima actividad, no se puede determinar la concentración de cAMP necesaria para producir 50% activación ($A_{0.5}$) para cada péptido. Asumiendo que activación completa implica disociación completa, la actividad máxima alcanzada con protamina representaría la desarrollada por toda la subunidad C libre capaz de ser generada. La V_{max} para los cuatro sustratos es aproximadamente igual para C_{Mr} libre (Tabla3) y la inhibición por exceso de cAMP es independiente de sustrato. Por lo tanto se puede

estimar de manera aproximada el grado de activación alcanzado con cada péptido a cAMP 1 mM tomando como máxima la actividad obtenida con protamina a 10 μ M y una inhibición del 50 % para cAMP 1 mM. En este caso los porcentajes de actividad alcanzados por S6, R4 y kemptido son 67%, 50% y 17%, respectivamente. Estos valores solo son válidos para el caso particular de los datos mostrados en la figura 13, ya que el grado de activación alcanzado es altamente dependiente de la concentración de enzima usada, cuando se trabaja en un rango en el cual la actividad no es proporcional a la concentración de enzima. Sin embargo, siempre se ha observado un grado de activación diferencial frente a los tres sustratos, para concentraciones variables de enzima.

Dependencia de la actividad con la concentración de holoenzima y el sustrato peptídico

Razonamiento: si la fosforilación de sustratos por la holoenzima en presencia de cAMP refleja la actividad de la subunidad catalítica libre, y la cantidad de C libre depende **solo** de la concentración de cAMP, se espera que la relación de actividades entre los diferentes sustratos sea similar a la que se muestra para la subunidad C libre en la Tabla 3.

Los datos de la Figura 14 ilustran el efecto de incrementar la concentración de holoenzima y cAMP sobre la relación de actividades de los péptidos seleccionados, expresadas relativas a la actividad con protamina.

Estas figuras se obtienen al re-graficar datos de un experimento como el mostrado en la Figura 12, realizados en presencia de cAMP 10 μ M (A) y 100 μ M (B). Los resultados indican que, a medida que se incrementa la concentración de enzima, las relaciones de actividades difieren significativamente de las esperadas para la subunidad C libre. Analizando los resultados surge que la diferencia entre sustratos se hace más evidente cuando el grado de activación de la enzima no está tan alejada de su máximo. Por ejemplo, en el panel A de la Figura 14, a 0.2 nM de holoenzima, se observan diferencias en la actividad específica aparente de la holoenzima comparada con la de la subunidad C libre. A mayores concentraciones de enzima la actividad fosforilante de péptidos disminuye a medida que aumenta la concentración de enzima casi hasta cero. Por otro lado, en el panel B, trabajando en presencia de cAMP 100 μ M, la actividad específica aparente de la holoenzima a bajas concentraciones de enzima es similar a la esperada para la subunidad C libre, mientras que a 3 nM, no tan

lejos de su activación completa, las diferencias en las actividades específicas de los distintos péptidos se hacen más evidentes.

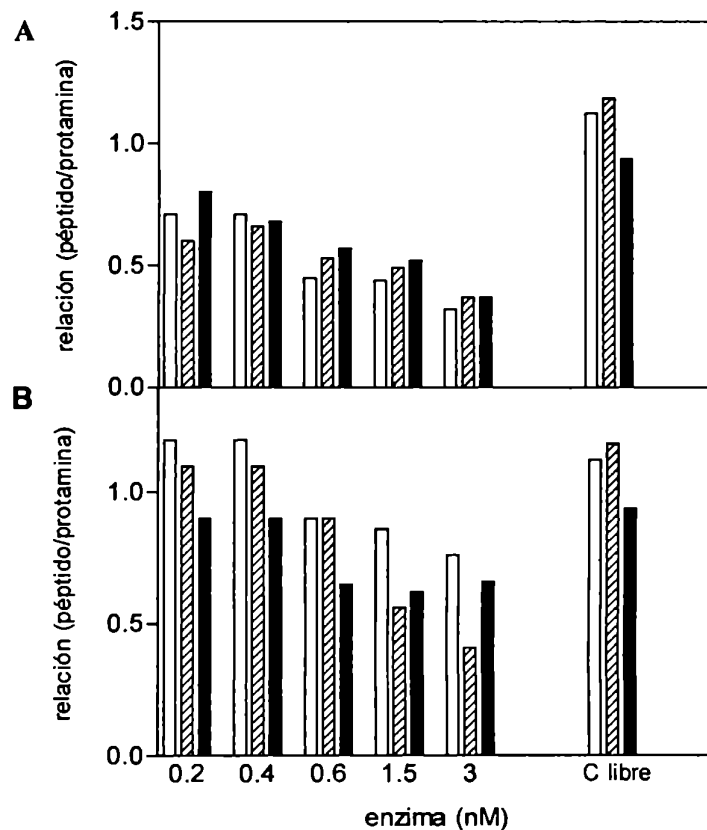


Figura 14- Dependencia de la relación de actividades de los sustratos con la concentración de holoenzima y el cAMP. Regráfica de los resultados de la figura 12 (A) y de un experimento equivalente realizado a una concentración de cAMP 100 μ M en el cual los datos absolutos para la fosforilación de protamina corresponden al 90% de los observados para cAMP 10 μ M. La actividad para cada sustrato peptídico se expresó relativa a la de la protamina, tomada como 1; las barras vacías corresponden a la relación kemptido / protamina (K/P), las barras rayadas a la relación R4 / protamina (R4/P) y las negras a la relación S6 / protamina (S6/P).

Efecto del péptido inhibidor sobre la actividad de la holoenzima

Siguiendo el mismo razonamiento que el usado en los experimentos descriptos anteriormente, se espera que si la subunidad catalítica libre es la responsable de la actividad desarrollada por la preparación de holoenzima, en presencia de cAMP, entonces la sensibilidad a la inhibición por el péptido inhibidor PKI₆₋₂₂ debería ser la misma que la observada para la subunidad catalítica libre.

La inhibición de la subunidad C libre por el péptido inhibidor fue independiente del sustrato utilizado (Figura 15)

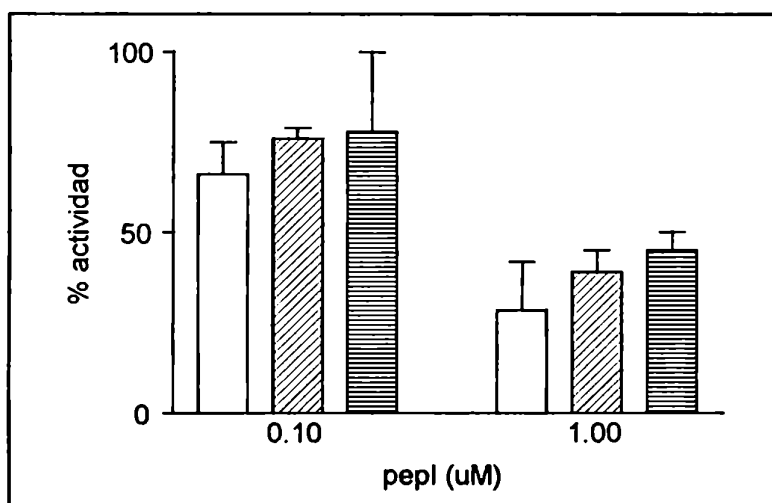


Figura 15- Sensibilidad de la subunidad C libre a la inhibición por PKI₆₋₂₂. Se ensayó la inhibición de la actividad fosfotransferasa por PKI₆₋₂₂ 0.1 ó 1 μ M, tal como se describe en M&M, usando los sustratos a su K_m . Los datos se expresaron como el porcentaje de actividad quinasa remanente en presencia de PKI para cada sustrato. Las barras vacías corresponden a kemptido, las de rayado oblicuo a R4 y las de rayado horizontal a protamina.

Se midió la actividad de PK A_{Mr} en presencia de PKI₆₋₂₂ 1 μ M y tres sustratos diferentes: kemptido, R4 y protamina, a sus respectivas K_m (Tabla 3). Como se observa en la Figura 16 el grado de inhibición alcanzado al usar kemptido o R4 depende de la concentración de enzima y/o cAMP; mientras que con protamina como sustrato, la inhibición alcanzada fue siempre igual y similar a la esperada para la subunidad C libre.

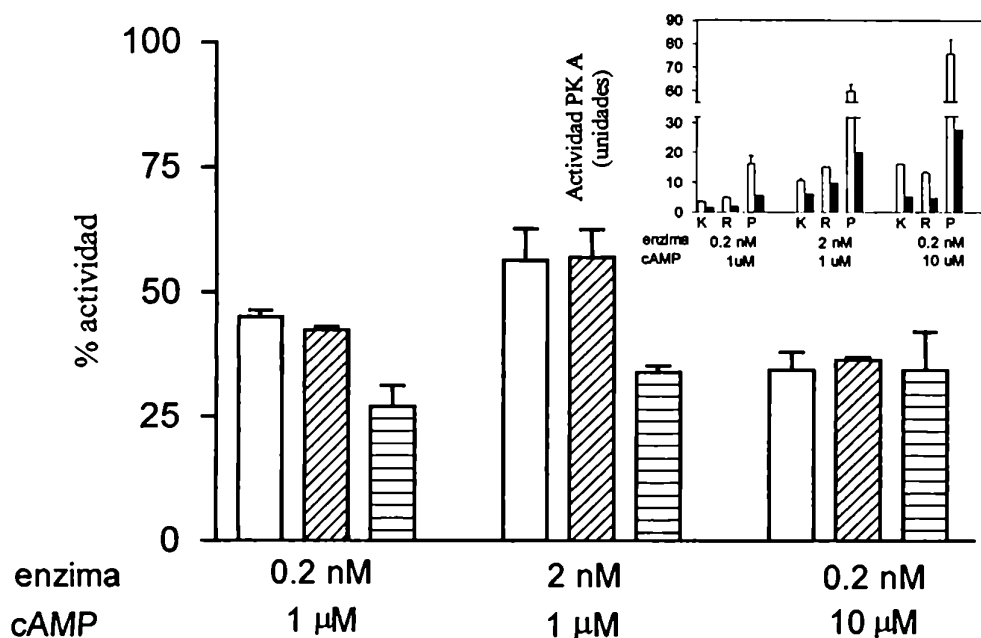


Figura 16- Sensibilidad de la holoenzima a la inhibición por PKI₆₋₂₂. Se ensayó la inhibición de la actividad fosfotransferasa igual que en la figura 15 en presencia de PKI₆₋₂₂ 1 μM. Los símbolos son los mismos que los de la Figura 15. El inserto muestra los valores de actividad en ausencia (barras blancas) o en presencia (barras negras) de PKI₆₋₂₂ 1 μM para kemptido (K), R4 (R) y protamina (P).

Modulación de la activación de la PK A por policationes

Se ha demostrado previamente que la activación de la PK A_{Mr} por cAMP a una concentración de enzima no lineal cuando se usa kemptido como sustrato es estimulada por la adición de policationes (Guthmann *et al* 1990). En el marco de esta Tesis se ha extendido el análisis a otros tres sustratos peptídicos: RRASVA (R2) (péptido 1), R4 y S6. Los policationes usados fueron polilisina (1 μg / ml) y un péptido básico derivado de la subunidad α (residuos 65-86) de la caseína quinasa II (CK2) (VVVKILKPV KKKKIKREIKILE). La concentración de holoenzima elegida para este ensayo fue de 0.2 nM; ya que a esta concentración la holoenzima se encuentra parcialmente activada a cAMP 0.1 μM y casi totalmente activada a 10 μM, cuando se usa kemptido como sustrato. Los resultados se muestran en la Figura 17 donde la relación de actividades esperadas para la subunidad C libre con los distintos sustratos (Tabla 3) se muestra a modo de comparación.

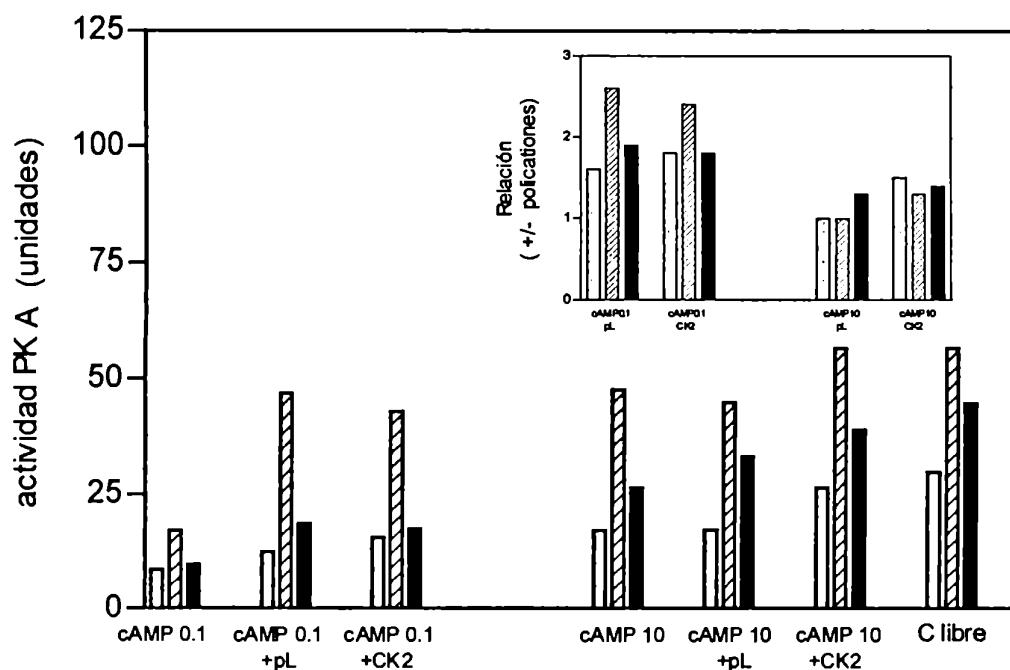
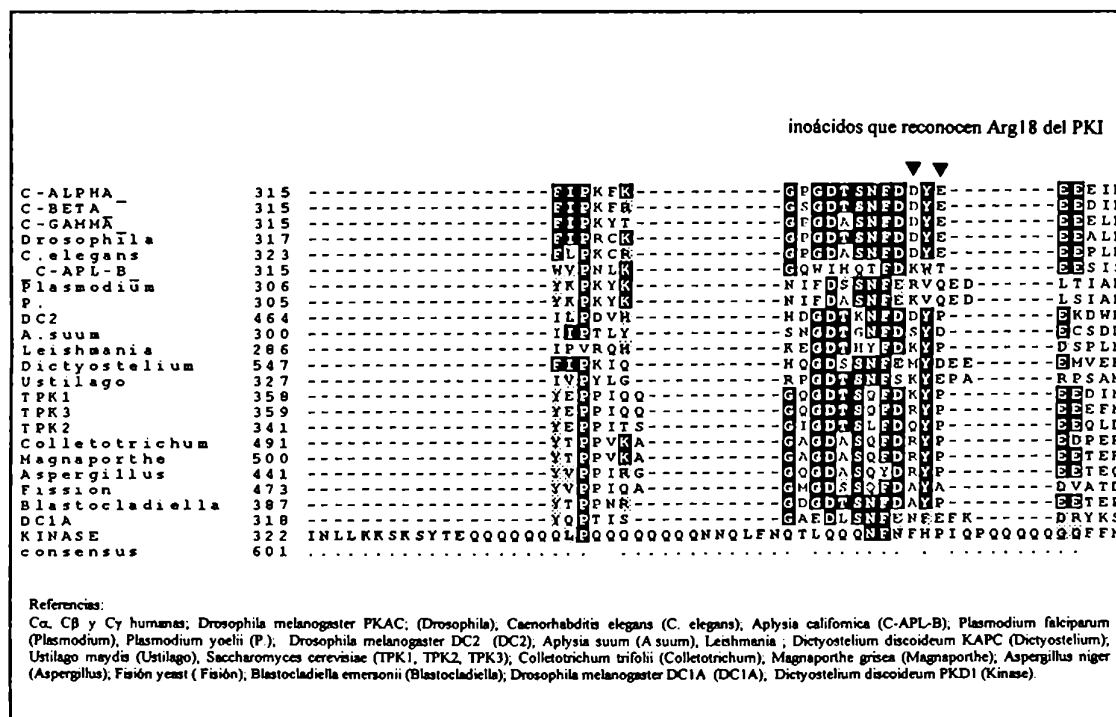


Figura 17- Modulación de la activación de la PK Apor polyclonales. En estos ensayos se utilizó una concentración de holoenzima de 0.5 nM. Los sustratos peptídicos fueron ensayados a 3 veces sus K_m : el péptido R2 (barras cuadriculadas) a 120 μ M, R4 (rayado oblicuo) a 15 μ M y S6 (barras negras) a 45 μ M. La polilisina (pL) se usó a 10 μ M y el péptido derivado de la caseína quinasa (CK2) a 0.3 μ M.

Como se puede observar en la figura, la modulación de la activación por cAMP a través de los polyclonales solo puede evidenciarse cuando la holoenzima está parcialmente activada, como se ha descrito ya para el kemptido (Guthmann *et al*, 1990). El grado de activación promovido por el polyclonación (Fig 17, inserto) fue dependiente del polyclonación en sí y del péptido usado como sustrato, siendo mayor para R4; el efecto fue absolutamente de la presencia de cAMP. Es interesante remarcar que la activación puede ser obtenida con un polipéptido artificial como es la polilisina y por un péptido obtenido de una proteína naturalmente encontrada como es la caseína quinasa 2.

Línea 1

Discusión



42

En el mismo análisis se pudo comprobar que todos los residuos restantes que han sido descriptos como importantes para la interacción de la subunidad C con los sustratos peptídicos o con el péptido inhibidor están conservados en todos estos organismos (ver apéndice final).

El razonamiento que subyace en el diseño de los experimentos con holoenzima es el siguiente: si la fosforilación de sustratos en presencia de cAMP es catalizada por la subunidad C libre sería de esperar que la relación de actividades entre sustratos o la sensibilidad a la inhibición por parte del péptido inhibidor fuesen iguales a las registradas en presencia de C libre. Sin embargo los resultados obtenidos indican que la actividad desarrollada por la holoenzima, la sensibilidad a la concentración de cAMP, a la modulación por policationes y a la inhibición por el péptido inhibidor son altamente dependientes de su concentración y del sustrato usado. Cuando la concentración de enzima está en el orden de subnanomolar y la concentración de cAMP es alta, la actividad desarrollada al usar una preparación de holoenzima parece reflejar el comportamiento esperado para la subunidad C libre. Sin embargo, a concentraciones enzimáticas superiores, en el orden de nM, y/o a concentraciones subsaturantes de cAMP el comportamiento de la holoenzima y el de la subunidad catalítica difieren completamente.

Dos interpretaciones no excluyentes podrían explicar estos resultados:

- a) solo la subunidad catalítica tiene actividad y por lo tanto activación implica necesariamente disociación; de esta manera el comportamiento de concentraciones de enzima variadas debería explicarse en función de las distintas cantidades de C libre producidas en cada caso;
- b) el complejo ternario holoenzima-cAMP_x puede tener actividad catalítica con una especificidad (relación V_{max}/K_m) distinta de la de la subunidad C libre. En este caso los resultados deberían ser interpretados como la actividad desarrollada por una combinación compleja de C libre, que sin duda puede generarse, y holoenzima activa.

Existen resultados de la literatura y del trabajo de nuestro propio grupo que pueden dar evidencias adicionales para sostener ambas hipótesis.

Si la primera hipótesis fuese correcta deberíamos explicar cómo se generan diferentes cantidades de C, partiendo de la misma cantidad de holoenzima en respuesta a la misma concentración de cAMP. Postulamos que en este caso el sustrato participaría del proceso de disociación, contribuyendo a la disociación conjuntamente con el cAMP. Sin embargo, los resultados observados con el péptido inhibidor no encajan bien en esta hipótesis, ya que aún si la C libre producida fuese el resultado de la activación de la holoenzima por cAMP y el sustrato, el porcentaje de

actividad no inhibida debería ser siempre la misma. Una posibilidad sería que el péptido inhibidor también participe en el proceso de disociación, como ha sido sugerido en el caso de una PK A de un eucariota superior (Johnson *et al*, 1993), en cuyo caso la cantidad de C libre generada dependería de la concentración de cAMP, del sustrato y del inhibidor.

Varias razones indican que la segunda hipótesis podría también ser viable. En primer lugar, Johnson *et al* (Johnson *et al*, 1993) han propuesto que la mejor alternativa para explicar sus resultados de transferencia de energía generada por resonancia de fluorescencia (técnica conocida en inglés como FRET), es que en condiciones de equilibrio, el cAMP promueve un cambio conformacional en la proteína quinasa, pero no su disociación en las subunidades libres. En segundo lugar se han aislado o construido algunas holoenzimas mutantes en las cuales mutaciones ya sea en R, en C o en ambas, resultan en holoenzimas activas no disociadas (Wang *et al*, 1991; Gibson & Taylor, 1997). En tercer lugar la quinasa de proteínas dependiente de cGMP, altamente homóloga a la PK A, es activada por la interacción con el cGMP, sin disociación. Si la holoenzima con cAMP unido fuese activa, sería razonable pensar que su selectividad o afinidad frente a los distintos sustratos no fuese la misma que la que presenta la subunidad C libre, como ocurre con la proteína quinasa C, en la cual cuando se remueve por proteólisis el dominio regulatorio, la afinidad del dominio catalítico por los sustratos difiere del de la enzima completa (Dekker & Parker, 1994).

En el caso de la PK A de *Mucor rouxii* se ha demostrado la existencia de un complejo ternario $cAMP_2R_2C_2$, en el cual el sitio B es el que está ocupado por cAMP, y este complejo resiste la disociación, ya que ha sido detectado por centrifugación en gradientes de sacarosa, aún bajo la presencia continua de cAMP en el gradiente (Pastori *et al*, 1981). Por lo tanto, la unión del cAMP al sitio B no es suficiente para promover la ocupancia del sitio A, ni para disminuir la interacción entre R y C de manera tal de promover la disociación de una concentración nM de enzima bajo condiciones de no-equilibrio. Sin embargo, en presencia de una proteína básica, como la histona, o alta sal (NaCl 0.5 M) PK A_{Mr} puede ser completamente disociada por el cAMP en sus dos subunidades regulatoria y catalítica (Pastori *et al*, 1981). En estas condiciones ambos sitios A y B están ocupados por cAMP (Moreno *et al*, 1983).

En un estudio reciente, Zhao *et al* (Zhao *et al*, 1998) analizando datos de dispersión de rayos-X y neutrones, demostraron que no hay cambios observables en la holoenzima recombinante murina $\Delta^{1-91}R_{II\alpha}C$ posteriores a la adición de cAMP y concluyeron que la unión del nucleótido no induce grandes cambios conformacionales en la subunidad R sugiriendo que la activación de la PK A podría estar causada por alteraciones relativamente sutiles en R inducidas por la unión de cAMP. En vista de

nuestros resultados podría ser posible que la presencia de policationes o del sustrato en sí mismo sumados a la holoenzima ocupada pudiese promover los cambios necesarios para activar la enzima. Dependiendo de la concentración de cAMP y de holoenzima, del sustrato y del entorno iónico, pueden ocurrir cambios conformacionales que resulten en situaciones que oscilan entre una holoenzima parcialmente activada, no disociada, a una holoenzima totalmente activada y disociada.

Una contribución interesante a esta discusión proviene de resultados de nuestro grupo en que se ha demostrado que los análogos N⁶-cAMP y C8-cAMP no difieren en su potencia de activación de PK A_{Mr}, cuando se trabaja a una concentración subnanomolar de enzima. Sin embargo, por encima de esta concentración, ya sea *in vitro* o en células permeabilizadas, la potencia relativa de los análogos difiere ampliamente, siendo los análogos-N⁶ mucho más potentes. Este comportamiento *in vitro* se correlaciona con el hecho de que *in vivo* los análogos-C8 no son capaces de producir efectos morfológicos sobre el hongo *Mucor rouxii* que sí se producen en respuesta al agregado de otros análogos al medio de cultivo (Pereyra *et al*, 1992; Pereyra, 1998).

Si bien la evidencia experimental presentada en esta Tesis no favorece ninguna de las dos hipótesis planteadas los resultados indican claramente que a altas concentraciones de enzima la actividad específica aparente de la holoenzima en presencia de cAMP depende del sustrato. Es posible que estos resultados puedan extenderse a las PK As de todos los organismos, con la excepción de que la diferencia en la actividad específica aparente entre la C libre y la holoenzima con cAMP unido deberían hacerse evidentes a distintas concentraciones de holoenzima, dependiendo de la afinidad intrínseca entre las subunidades C y R de la enzima en cuestión. Sin embargo, teniendo en cuenta que la concentración intracelular de la PK A es del orden de micromolar, cercana a la del cAMP (Beavo *et al*, 1974) es de esperar que sea muy significativo el efecto de la modulación de su actividad por los sustratos y por policationes. De esta manera se añade una nueva fuente de regulación de la PK A donde la subunidad R podría participar en la especificidad del evento de fosforilación.

Línea 2: Rol de la subunidad R en el mecanismo de activación de la PKA.

Hipótesis -línea 2-

1-El ranking de los fenotipos de las mutantes *bcy1* refleja el estado de fosforilación de sustratos de PK A y este estado es variable, dependiendo de un defecto progresivo en uno o más aspectos de la función de la subunidad R.

2-Es posible la activación de la holoenzima sin disociación en presencia de cAMP

Objetivo

Conocer las bases bioquímicas que justifiquen la reversión diferencial de los fenotipos *ras2*, que presentan cepas mutantes (*bcy1*) en la subunidad R de la PK A de *Saccharomyces cerevisiae*.

intro

Saccharomyces cerevisiae

La finalización del proyecto de secuenciación del genoma de *S.cerevisiae* ha permitido determinar no solo el número total de genes presentes en un organismo, sino el número exacto de genes de un tipo particular. Como consecuencia, ahora se sabe exactamente cuantas quinasas de proteínas están codificadas por el genoma de la levadura, un número de considerable interés dada la importancia que la fosforilación de proteínas tiene en el control de tantos procesos celulares.

Las levaduras contienen 113 genes que codifican para quinasas de proteínas convencionales, lo que corresponde al 2% del total de genes encontrados (Hunter, 1997). A más del 60% de estas proteínas les ha sido adjudicada una función conocida o posible.

A pesar de que todos los organismos eucariontes poseen requerimientos similares en cuanto a replicación del DNA, transcripción, traducción y metabolismo energético, es razonable esperar que algunas quinasas de proteínas se encuentren solo en organismos multicelulares funcionando en la comunicación, tanto entre células o tejidos como con el ambiente. De esta manera no se han encontrado en levaduras tirosina quinasas verdaderas, como tampoco proteínas relacionadas íntimamente con la quinasa dependiente de cGMP.

En lo que a la vía del cAMP se refiere un hecho significativo es que no surja del análisis del genoma un gen que codifique para la proteína inhibidora de PK A (PKI).

Transducción de señales en levaduras

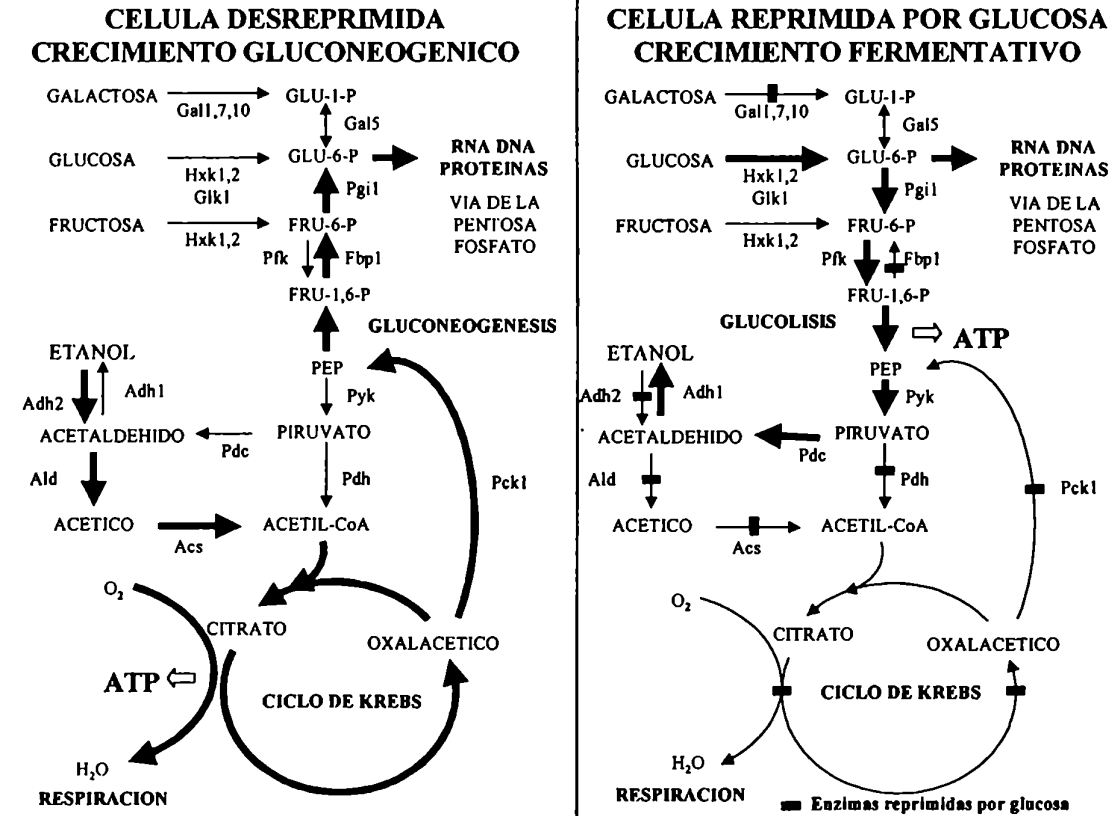
En organismos multicelulares la mayoría de los caminos de transducción de señales son disparados por hormonas o factores de crecimiento, de manera específica, para producir cambios que afecten el metabolismo, la proliferación o el desarrollo de la célula blanco. En microorganismos, en cambio, los principales agentes extracelulares que afectan estos parámetros son los nutrientes. En determinadas circunstancias los nutrientes también pueden disparar fenómenos regulatorios en organismos multicelulares. Un ejemplo bien conocido es el de la liberación de insulina inducida por glucosa en las células del páncreas. También se han descrito mensajeros extracelulares similares a hormonas que actúan en microorganismos, como es el caso de las feromonas sexuales en levaduras.

La desventaja de los nutrientes como inductores de los caminos de señalización intracelulares es que siempre cumplen el rol de servir como fuente de energía y/o sustrato en adición a cualquier función regulatoria que presenten. Esto complica el análisis de su mecanismo de acción y de los caminos de señalización asociados a sus efectos regulatorios.

Las levaduras poseen caminos de transducción de señales similares a los observados en mamíferos. La principal diferencia radica en la señal primaria y el blanco final, esto es el “para qué” son utilizados. El control de nutrientes en el medio parece ser la primer fuente de transducción de señales en la evolución temprana. Subsecuentemente estos caminos se han ido duplicando y/o modificando para servir para propósitos más sofisticados, como ser señalizar la presencia de feromonas, condiciones de estrés, etc. Finalmente, en organismos multicelulares la principal función de la transducción de señales es la de la comunicación entre células. Es por esto que se postula (Thevelein, 1994) que los bien conocidos caminos de transducción de señales en mamíferos, mediados por hormonas o factores de crecimiento, tienen su origen evolutivo en los caminos de señalización inducidos por nutrientes que se han desarrollado en microorganismos primitivos con el fin de ajustar su metabolismo a fluctuaciones en los niveles de nutrientes del medio.

Transducción de señales inducida por glucosa

La glucosa es sin dudas uno de los más prominentes mensajeros en levaduras. El efecto que ejerce sobre las células de levadura recuerda al que ejercen las hormonas sobre células de mamíferos, en cuanto a su efecto drástico y amplio sobre el metabolismo celular y en cuanto al mecanismo de acción involucrado (Thevelein, 1994). La adición de glucosa o azúcares relacionados rápidamente fermentables como ser manosa o fructosa, a células de *Saccharomyces cerevisiae* creciendo en un medio con fuente no-fermentable de carbono, como etanol o glicerol, o células en fase estacionaria, dispara una variedad muy amplia de fenómenos regulatorios (Ronne, 1995). Rápidamente se activan o inactivan varias enzimas o proteínas de transporte tanto a nivel post-traducciona l como transcripcional, ya que se reprimen o inducen diversos genes. El principal rol de los efectos regulatorios inducidos por la glucosa parece que fuera el lograr que el cambio de metabolismo de la forma gluconeogénica / respiratoria a la forma fermentativa sea eficiente (Thevelein, 1994) (Figura 19). Muchos de los genes reprimidos corresponden a enzimas involucradas en gluconeogénesis y respiración mientras que muchos de los componentes inducidos funcionan en la glucólisis y en la utilización de carbohidratos almacenados.



Camino principal de represión por glucosa

El principal efecto de este camino es el de apagar la respiración durante el crecimiento en altos niveles de glucosa y azúcares rápidamente fermentables relacionados. Se han identificado muchos genes que están involucrados en este camino de alguna manera. Estos pueden ser clasificados en dos grandes tipos:

- genes requeridos para la represión, como por ejemplo *HXK2* (hexoquinasa P II)
- genes requeridos para la de-represión, como por ejemplo *CAT1/SNF1* (proteína quinasa que inactiva el complejo de represión)

En la Figura 20 se muestra un esquema simplificado de este camino.

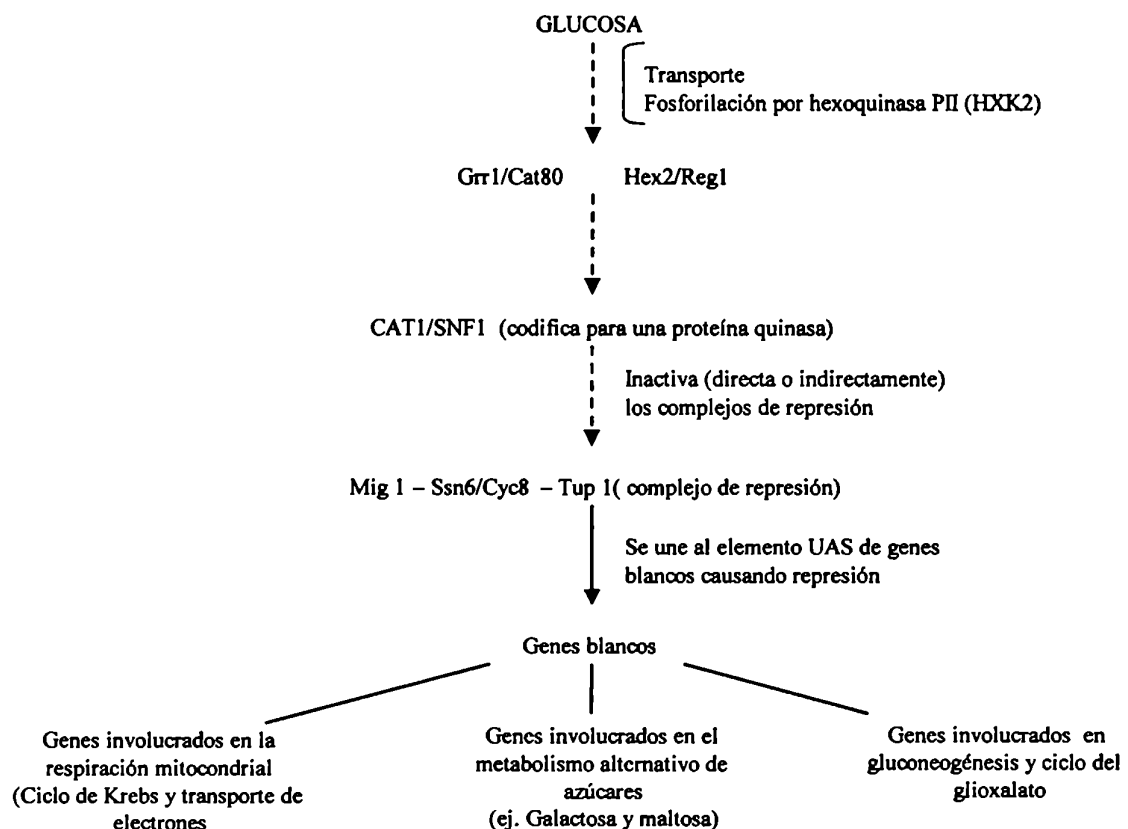


Figura 20 - Camino principal de represión por glucosa

El camino de represión por glucosa controla otros caminos de inducción específica. Ejemplos bien conocidos son los caminos de inducción de los genes *GAL* por galactosa, de

los genes *MAL* por maltosa y de los genes *CYC* involucrados en la respiración mitocondrial, por el oxígeno. La conexión entre el camino de represión por glucosa y los otros caminos se da en cada caso mediante la represión de algún componente requerido para el mecanismo de inducción, como por ejemplo la proteína Gal4 para la inducción de los genes *GAL*.

El cambio de metabolismo en presencia de glucosa, de gluconeogénesis y respiración a fermentación no solo se alcanza reprimiendo genes involucrados en gluconeogénesis y respiración sino por inducción de genes involucrados en fermentación. Varias enzimas glicolíticas son inducidas, como ser piruvato decarboxilasa, alcohol deshidrogenasa I, enolasa II, piruvato quinasa y 6-fosfofructo-2-quinasa.

Un esquema general de los principales puntos de regulación se muestra en la Figura 19.

Transducción de señales vía PK A

Propiedades fenotípicas controladas por PK A

La depleción de cAMP o la inactivación de la PK A en células de *S. cerevisiae* provocan un arresto de la proliferación y una entrada permanente en fase estacionaria G_0 . Antes de entrar en G_0 , las células se arrestan en G_1 , en el mismo punto al que llegan células sometidas a ayuno de nutrientes. Esto ha llevado al desarrollo del concepto que el camino cAMP-PK A de alguna manera señaliza la disponibilidad de nutrientes a la maquinaria del ciclo celular. Cuando las células entran en G_0 adquieren las características típicas de fase estacionaria: fuerte acumulación de trehalosa y glucógeno; alta resistencia a condiciones de stress; fuerte expresión de una variedad de genes controlados por elementos STRE (stress-response element) en sus promotores y baja expresión de genes de proteínas ribosomales (Thevelein & Winder, 1999)

Células que crecen en medios con fuentes no fermentables de carbono también presentan de alguna manera estas características.

Está bien aceptado el concepto de que en células creciendo en presencia de glucosa prevalece una alta actividad de PK A, mientras que en células privadas de glucosa predomina una baja actividad de PK A. Sin embargo ha habido una gran controversia al tratar de establecer si esta diferencia en la actividad de PK A se debía a un aumento de cAMP disparado por la presencia de glucosa.

Mutantes con el camino cAMP-PK A demasiado activo o con muy baja actividad muestran defectos fenotípicos muy severos y específicos.

Se ha observado que un camino demasiado activo causa:

- sensibilidad al shock por calor y al ayuno de nutrientes (y seguramente a condiciones de stress en general),

- bajos niveles en la reserva de carbohidratos como son el glucógeno y la trehalosa,
- dificultad para arrestar apropiadamente en fase G₁ del ciclo celular en condiciones limitantes de nutrientes,
- inhabilitación para crecer en fuentes no fermentables de carbono (glicerol, etanol, acetato) y en fuentes de carbono débilmente fermentables como ser galactosa
- falta de esporulación en células diploides

Una actividad reducida de este camino provoca:

- aumento en la resistencia a condiciones de stress,
- aumento de los niveles de glucógeno y trehalosa,
- expresión constitutiva de genes que solo se expresan en cepas salvajes en fase estacionaria,
- esporulación de células diploides en medio rico, medio que normalmente es supresivo. Una actividad demasiado baja (por ejemplo en cepas que carecen de subunidad C de PK A) es letal dado que se previene la progresión a través del punto "Start" en G₁ y se produce un bloqueo en G₀.

Se han propuesto dos caminos distintos para mediar los efectos transientes y sostenidos sobre los blancos de acción de la PK A en levaduras. Un camino de respuesta rápida que involucraría la síntesis de cAMP por activación de la adenilato ciclasa, a través de los sistemas de señalización vía Ras y Gpr1-Gpa2; y un camino de mantenimiento de los efectos asociados a la acción de PK A durante el crecimiento, denominado camino inducido por crecimiento en medio fermentable (FGM por "Fermentable-Growth-Medium-Induced-Pathway") (Kraakman *et al*, 1999; Vanhalewyn *et al*, 1999). Este último camino sería dependiente de la quinasa de proteínas Sch9, de manera independiente de cAMP (Crawels *et al*, 1997; Thevelein & Winder, 1999).

Señalización a través de la adenilato ciclasa

1-Camino RAS-adenilato ciclasa

2-Sistema Gpr1-Gpa2. Activación de AC inducida por glucosa.

1-Camino RAS-adenilato ciclasa

La búsqueda de homólogos de los genes *ras* de mamíferos en levaduras y el aislamiento de mutantes deficientes en la síntesis de cAMP han llevado a la identificación del camino RAS-adenilato ciclasa (AC) (Matsumoto *et al.*, 1985; Tatchell, 1986, 1993; Wigler *et al.*, 1988; Gibbs and Marshall 1989; Broach and Deschenes, 1990). Un esquema de este camino se muestra en la Figura 21. En *S. cerevisiae*, los productos de los genes *RAS1* y *RAS2* actúan como los equivalentes funcionales de las proteínas G_s de mamíferos, que ejercen su acción sobre la adenilato ciclasa. Esta última está codificada por el gen *CYR1/CDC35*. Tal como ocurre con las clásicas proteínas G, las proteínas Ras son activas cuando están unidas a GTP e inactivas cuando están unidas a GDP. La actividad GTPásica intrínseca de las proteínas Ras en levaduras está estimulada por los productos de los genes *IRA1* e *IRA2*, que actúan por lo tanto como inhibidores del camino. La delección de uno de los genes *RAS* no afecta la viabilidad mientras que la delección de ambos genes es letal. Se han obtenido variantes mutadas de *RAS* en levaduras equivalentes a alelos oncogénicos de *ras* de mamíferos (con la misma mutación en la posición aminoacídica correspondiente). Uno de los ejemplos mejor estudiados es *RAS2^{val19}*. Este alelo dominante tiene muy reducida su actividad GTPásica y es insensible a la acción de las proteínas Ira. Cepas que contienen este alelo o que llevan delecciones de los genes *IRA*, muestran fenotipos típicos de las cepas con el camino Ras-cAMP super-activo. El producto del gen *CDC25* estimula el intercambio de GDP por GTP en las proteínas Ras y por lo tanto actúa como un activador del camino. Tanto Ras como Cdc25 son requeridas para mantener los niveles de cAMP basales adecuados. El producto del gen *CAP/SRV2* corresponde a una proteína bifuncional, la cual se une a la adenilato ciclasa. La porción amino terminal parece estar involucrada en el control de la adenilato ciclasa por las proteínas Ras de manera no clara aún, mientras que la porción C terminal participaría en un camino totalmente diferente conectado de alguna manera en la regulación de la formación del citoesqueleto (Thevelein, 1994).

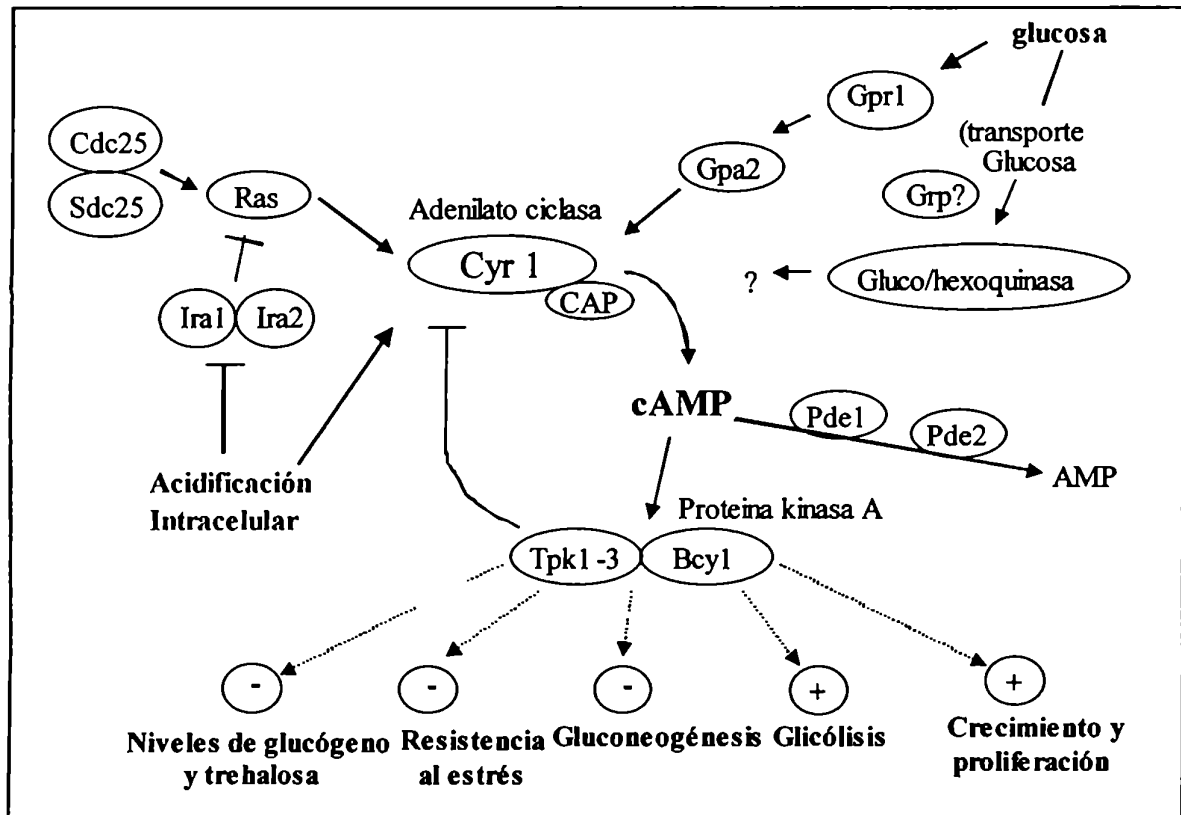


Figura 21- Modelo proponiendo los mecanismos por los cuales la glucosa y la acidificación intracelular controlarían la actividad de adenilato ciclasa.

En levaduras la función del cAMP parece ser exclusivamente la de activar la proteína kinasa A. Esta enzima es un tetrámero formado por dos subunidades catalíticas (genes *TPK1*, *TPK2* y *TPK3*) y dos subunidades regulatorias (gen *BCY1/SRA1*). La anulación de los tres genes *TPK* es letal mientras que la falta del gen *BCY1* tiene alcances severos provocando fenotipos típicamente asociados con una alta actividad de la PK A. Los productos de los genes *TPK* aparentemente se superponen en el reconocimiento de sustratos, al menos para varios blancos, pero también son capaces de desarrollar actividades distintas (Thevelein & Winde, 1999)

El cAMP es degradado por las fosfodiesterasas de baja y alta afinidad, codificadas por los genes *PDE1* y *PDE2* respectivamente. La K_m de la enzima codificada por el gen *PDE2* se encuentra en el mismo rango que la concentración de cAMP estimada presente en el citosol. La delección de este gen provoca los mismos fenotipos observados en mutantes con el camino Ras-cAMP super-activo. Un posible rol para esta enzima sería el de proteger a la célula de la

incorporación de cAMP exógeno. La K_m de la fosfodiesterasa de baja afinidad codificada por el gen *PDE1* es como mínimo un orden de magnitud mayor que la concentración de cAMP citosólica y su delección no produce los fenotipos típicos de un camino Ras-cAMP super-activo.

Se conocen solo dos condiciones capaces de disparar la señalización a través de la adenilato ciclase en células en crecimiento vegetativo, la presencia de azúcares rapidamente fermentables, como glucosa, fructosa o manosa y la acidificación intracelular. La adición de una alta concentración de glucosa a células de *S. cerevisiae* desreprimidas (ya sea células creciendo en un medio con fuente no fermentable de carbono o provenientes de fase estacionaria) o la acidificación intracelular (tanto en células reprimidas como desreprimidas) disparan un aumento transitorio de los niveles de cAMP, en pocos segundos, en condiciones óptimas. En el caso de la acidificación intracelular el aumento es más pronunciado y prolongado.

Como ha sido sugerido (Thevelein, 1994) podría ser que el principal rol de la señalización vía AC sea el de indicar a la maquinaria celular que en el medio hay niveles **adecuados** de azúcar rápidamente fermentable mas que el de detectar su mera presencia. Esta propuesta se basa en que bajas concentraciones de glucosa no activan de manera apreciable este camino. Son necesarias concentraciones de 15-20 mM para aumentar un 50% la señal por cAMP (Thevelein, 1991, 1994, 1999).

El crecimiento rápido en medio rico se correlaciona con un aumento de la actividad del camino Ras. Esta correlación parece tener un significado funcional, ya que cepas con este camino hiperactivo, ya sea por poseer el alelo *RAS2^{Val19}* o una delección del gen *BCY1*, no son capaces de responder apropiadamente a condiciones que atenúan el crecimiento (Toda *et al*, 1987; Engelberg *et al*, 1994). Por otra parte la pérdida de la actividad Ras provoca una disminución de los niveles de cAMP que llevan a un arresto del crecimiento al principio de G1 (Matsumoto *et al*, 1985; Tatchell *et al*, 1985; Toda *et al*, 1985). El arresto de crecimiento por la ausencia de actividad Ras puede ser suprimido mediante la activación de componentes del camino que se encuentran debajo de la acción de Ras, como ser mutaciones que inactiven *BCY1*, indicando que la única función esencial de Ras es la de producir cAMP (Jiang *et al*, 1998).

Mientras que los fenotipos de mutaciones de RAS que activan o inactivan la proteína sugieren que Ras ajusta los niveles de cAMP en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, controlando de esta manera las actividades metabólicas y del ciclo celular en la célula, otras observaciones sugieren que este modelo simple no describe adecuadamente el rol de Ras en levaduras:

-No se ha podido encontrar aún la conexión entre Ras y algún tipo de maquinaria que sense la disponibilidad de nutrientes.

-Las diferencias en los niveles de cAMP en medio rico versus medio pobre o en presencia de alelos activantes versus salvaje de Ras son muy modestos (Nikawa *et al*, 1987; Russell *et al*, 1993)

-Células que expresan de manera constitutiva bajos niveles de actividad PK A, muestran, en esencia, un comportamiento normal en el patrón de crecimiento. Esto se ha observado con cepas Tpk^w. Estas cepas muestran un comportamiento fenotípico similar al observado en una cepa salvaje, sugiriendo que mientras las células necesitan de una actividad basal de Ras para sobrevivir, no requerirían de la señalización vía Ras para ajustar el crecimiento a distintas condiciones o en respuesta a un arresto de crecimiento (Cameron *et al*, 1988).

-En aparente contradicción con trabajos anteriores, se ha demostrado recientemente que Ras no media el aumento de cAMP inducido por glucosa en células desreprimidas (ver más adelante) (Colombo *et al*, 1998).

Jiang y colegas han observado que la señalización mediante Ras es necesaria para retomar el crecimiento después de una situación de ayuno, de manera óptima (Jiang *et al*, 1998). Ellos observaron que en cepas incapaces de señalizar vía Ras, la transición de un medio pobre a uno rico no era eficiente, se observaba un retraso. ¿Por qué la ausencia de un incremento transiente de la actividad de PK A causa un retraso en el reinicio del crecimiento en medio rico?

-1-Se sabe que hay toda una reconfiguración diferente, a largo plazo, del camino glicolítico y el ciclo del ácido cítrico, alterando los niveles de expresión de ciertas enzimas.

-2- A corto plazo la reconfiguración se daría mediante regulación alostérica en puntos termodinámicamente sensibles del camino. Por ejemplo PFK y FBPasa, ambas fosforilables in vivo por PK A.

Si se consideran diferentes configuraciones de enzimas metabólicas y componentes del citoesqueleto para distintos estados semi-estables, como ser crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, en fuentes de carbono fermentables o durante quiescencia (fase estacionaria o esporas), una vez que se ha establecido el patrón de expresión apropiado y la configuración de enzimas metabólicas y la estructura celular adecuada de un determinado estado de crecimiento, ese estado entonces se auto-sostiene. En este escenario un pico de actividad de PK A serviría para cambiar a otro estado metabólico. Con esta perspectiva habría que distinguir la señalización a través de RAS/cAMP para el establecimiento de un estado metabólico particular, del rol que juegan los niveles basales de cAMP en mantener esos estados celulares (Figura 22).

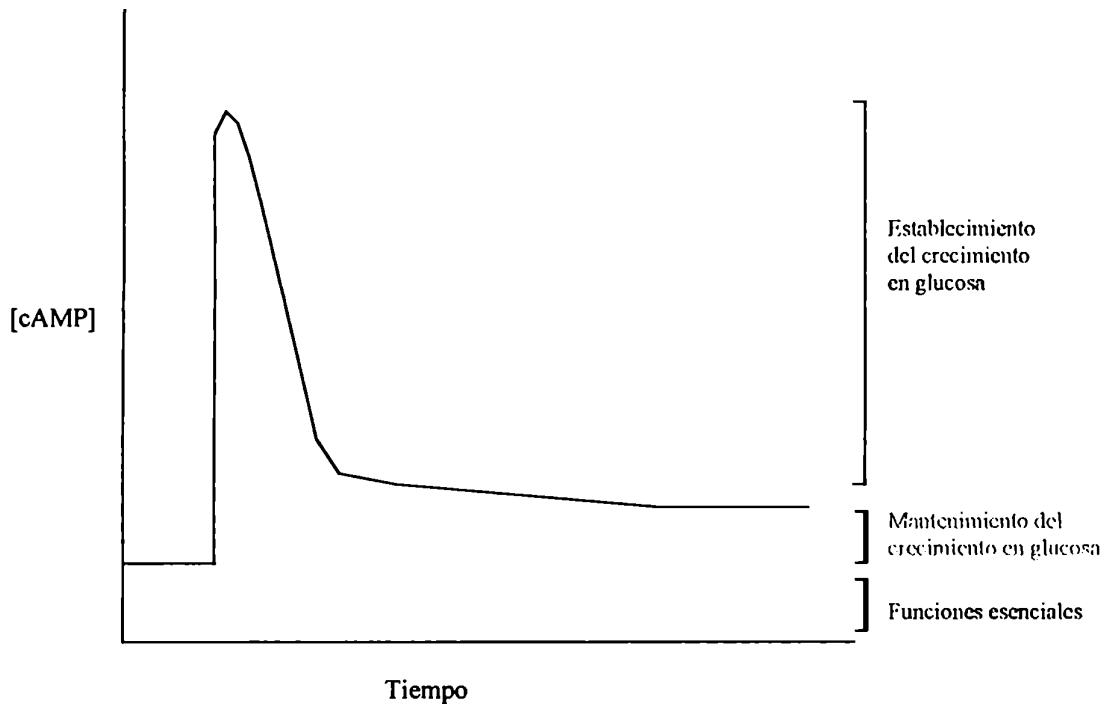


Figura 22- Distintos roles del cAMP en la célula. Los antecedentes en este tema sugieren que niveles pre-estimulados de cAMP mantienen funciones celulares esenciales; los niveles basales ligeramente superiores presentes en células creciendo en glucosa serían necesarios para mantener el estado metabólico fermentativo, y el pico transiente promueve una transición eficiente del crecimiento no fermentativo al fermentativo.

La actividad Ras es responsable del aumento de cAMP disparado por acidificación intracelular. Se ha observado que la acidificación intracelular aumenta la relación GTP/GDP unido a Ras y que este efecto es independiente de Cdc25 y Sdc25 y que depende en parte de las proteínas Ira1 e Ira2. Se postula que debe existir otro blanco de la acidificación intracelular ya que el efecto persiste en cepas que carecen de ambos genes *IRA* y que posiblemente sea la misma AC. El rol fisiológico de la estimulación de la síntesis de cAMP por la acidificación intracelular ha sido siempre un enigma. Podría ser un enlace entre la falta de ATP y su regeneración durante el ayuno de carbono. Bajo estas condiciones el pH intracelular baja. El incremento en los niveles de cAMP puede provocar la movilización de hidratos de carbono almacenados generando en consecuencia un aumento en la generación de ATP. Se sabe que el glucógeno y la trehalosa son consumidos por las células de levaduras durante el ayuno, y que la acidificación intracelular provoca la movilización de trehalosa y un aumento de la fermentación endógena debido presumiblemente a la activación de la trehalasa inducida por cAMP (Figura 23).

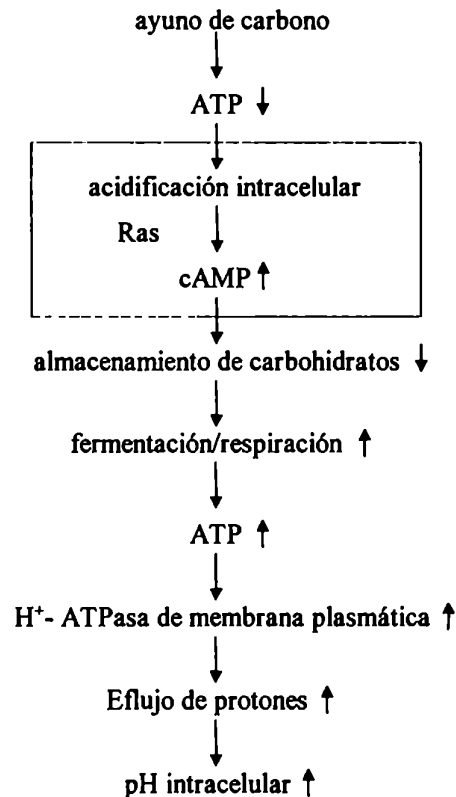


Figura 23: Mecanismo propuesto para la estimulación de la síntesis de cAMP por bajo pH intracelular en células hambreadas de fuente carbonada.

2-Sistema Gpr1-Gpa2. Activación de AC inducida por glucosa.

Se ha descrito muy recientemente un sistema de receptor acoplado a proteína G (GPCR, de G-protein-coupled-receptor) compuesto por Gpr1 y su proteína G α , Gpa2, capaz de modular los niveles de cAMP, en respuesta a glucosa (Colombo *et al*, 1998; Kraakman *et al*, 1999; Thevelein & Winde, 1999).

El gen *GPR1* codifica para un receptor perteneciente a la familia de receptores con 7 dominios transmembrana que está acoplado a la proteína Gpa2. El gen *GPA2* ha sido clonado a partir de una biblioteca genómica por hibridización con sondas de cDNA correspondientes a las proteínas G $_{12a}$ y G $_{oa}$ de cerebro de rata. A pesar de haberse obtenido evidencia que indicaba un posible rol de esta proteína en el control de los niveles de cAMP, no se encontraron diferencias entre la señal disparada por glucosa entre células salvajes y células que poseen una delección del gen *GPA2* (Nakafuku *et al*, 1988). Recientemente se ha re-investigado el posible rol de Gpa2 en el control de los niveles de cAMP y se ha encontrado

que es la encargada de mediar la señal entre la glucosa y la adenilato ciclasa (Colombo *et al*, 1998). A diferencia de los estudios anteriores Colombo y sus colegas evitaron la interferencia del efecto fuertemente estimulante que tiene el bajo pH intracelular en la síntesis de cAMP.

Se sabe que la adición de glucosa a células de levaduras desreprimidas provoca también de manera transitoria acidificación intracelular. El efecto sobre el pH intracelular inducido por glucosa puede anularse mediante la adición de NH_4Cl a alto pH extracelular o el agregado previo de una pequeña cantidad de glucosa, la cual produce un aumento en los niveles de ATP y en el pH intracelular pero no dispara el pico de cAMP (Colombo *et al*, 1998). Trabajando en estas condiciones se observó que en ausencia del gen *GPA2* se elimina completamente la señal de cAMP inducida por glucosa.

Estos resultados vuelven a ubicar a la adenilato ciclasa de levadura dentro de los conceptos clásicos establecidos para la regulación de adenilato ciclasas de mamíferos por sistemas GPCR. Durante muchos años se responsabilizó a la actividad Ras de este efecto sobre la actividad AC, por lo cual estos hallazgos obligan a replantear el verdadero rol del control de la AC dependiente de Ras.

Observaciones sobre Ras y Gpa2

- Ras2 y Gpa2 serían parcialmente redundantes.
- Ras1 y Ras2 pueden compensar la falta de Gpa2, pero no al revés.
- Mutantes defectivas en solo uno de los dos genes no presentan defectos de crecimiento, pero las doble mutantes *ras gpa2* crecen muy lentamente en medio rico (Kübler *et al*, 1997; Xue *et al*, 1998). Este defecto puede ser suprimido por el agregado de cAMP exógeno o mutaciones en el gen *PDE2* (Kübler *et al*, 1997; Xue *et al*, 1998)
- El efecto de la delección de Gpa2 sobre los blancos de PK A está confinado al período de transición de crecimiento en glucosa. Las fluctuaciones generales en las características controladas por PK A durante el crecimiento diauxico no se ven afectados (Colombo *et al*, 1998).
- Se ha propuesto que el sistema Cdc25-Ras no solo mantendría los niveles basales de actividad adenilato ciclasa sino que sería responsable de la localización de AC en la membrana plasmática, para una interacción óptima con el sistema Gpr1-Gpa2 (Thevelein & Winde, 1999).
- En *S. cerevisiae* la capacidad de sintetizar cAMP es muy alta. La adición de glucosa y la acidificación intracelular producen un aumento muy importante de los niveles de cAMP en

segundos. Tal vez la asociación de Ras aumenta la capacidad de respuesta de AC frente a la estimulación de su actividad por Gpa2.

-Por otra parte mutantes con el camino de cAMP super activo mueren rápidamente en fase estacionaria y son incapaces de crecer sobre fuentes no fermentables de carbono (Thevelein, 1992, 1994, Tatchell, 1993). Por lo tanto parece ser esencial para las levaduras poder restringir y controlar la alta capacidad de la adenilato ciclasa precisamente en estas condiciones.

Sustratos de PK A en *S cerevisiae*

Algunos sustratos proteicos de las subunidades catalíticas han sido inequívocamente identificados. Estos incluyen, en particular, enzimas del metabolismo de carbohidratos y de lípidos: trehalasa, glucógeno sintasa, glucógeno fosforilasa, fosfofructokinasa 2, fructosa-1,6-bisfosfatasa, isocitrato liasa, fosfatidilserina sintasa y fosfatidato fosfatasa. El control post-traducciona l de enzimas del metabolismo de carbohidratos de reserva (en adición con el control a nivel transcripcional, ver más adelante) puede explicar el fuerte efecto que tiene la PK A sobre los niveles de trehalosa y glucógeno. Recientemente se han identificado nuevos sustratos que juegan roles regulatorios por debajo de la acción de la PK A (Figura 24) como ser los factores de transcripción Msn2 y Msn4 que median en parte la regulación de la expresión de genes controlados por elementos STRE (Smith *et al*, 1998). La localización subcelular de estos factores está modulada por la actividad de PK A (Görner *et al*, 1998). La proteína quinasa Rim 15 también ha sido identificada como blanco de PK A, que actúa como activador de la expresión genes controlados por elementos STRE ante la entrada en fase estacionaria.

Otra proteína que debe funcionar por debajo de la PK A es Sok2. El gen *SOK2* fue aislado como un supresor de la deficiencia de actividad PK A (Ward *et al*, 1995). La posición precisa de Sok2 debajo de la PK A y en particular respecto de Msn2, Msn4 y Rim 15 aún no ha podido ser determinada.

El factor de transcripción Adr1 ha probado ser sustrato de la PK A in vitro, aunque no está claro el rol que esta fosforilación pudiera tener in vivo (Dombek *et al*, 1993).

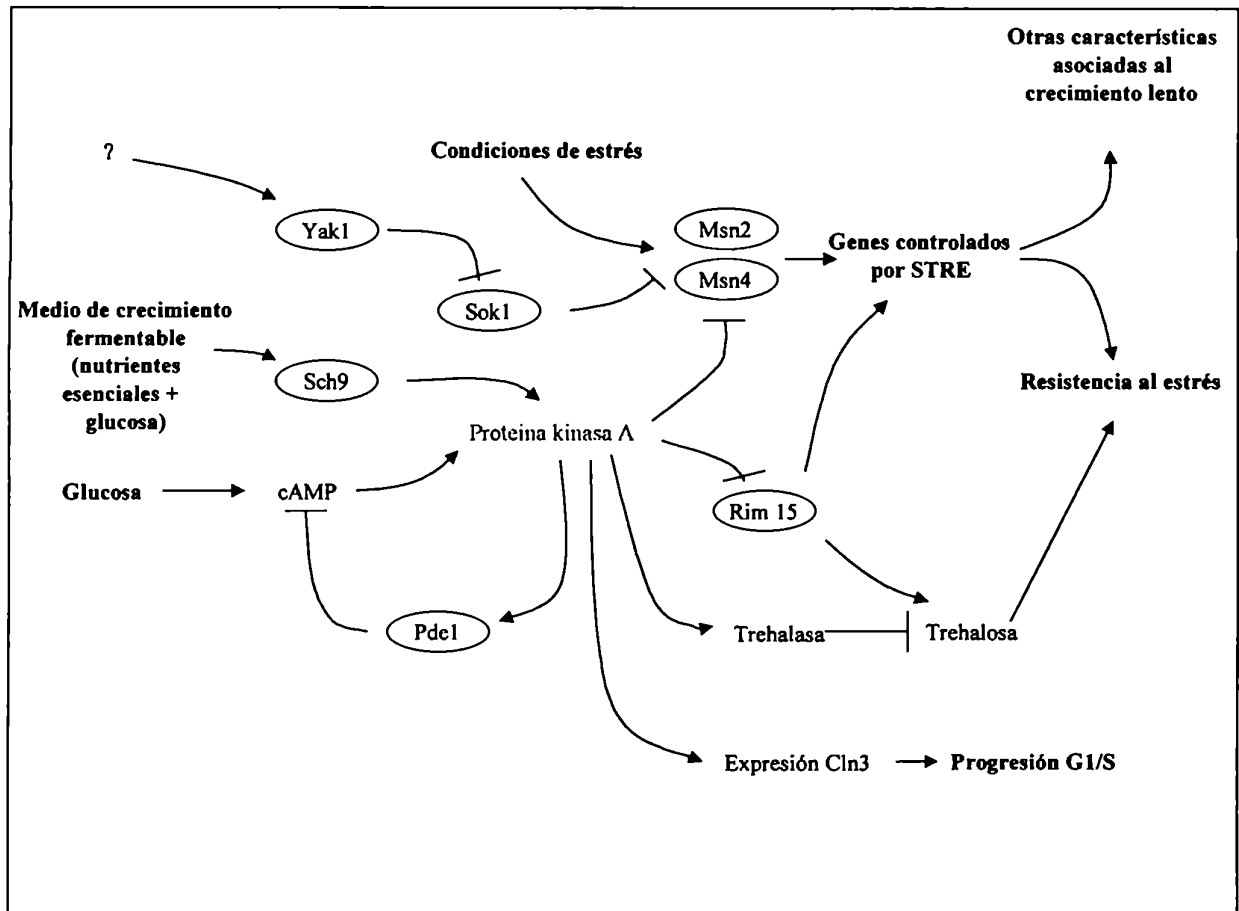


Figura 24- Sustratos-blanco en el camino de transducción por cAMP-PKA

Las subunidades catalíticas ejercen un fuerte control negativo (retroalimentación negativa) sobre la síntesis de cAMP, dado que cepas con baja actividad de PK A ($tpk2\Delta$ $tpk3\Delta$ $tpk1^w$ del inglés “weakened”) son capaces de sintetizar 100-1000 veces más cAMP respecto de la condición salvaje (Nikawa *et al*, 1987). Han sido varios los blancos postulados para este mecanismo de control negativo: Cdc25 (Munder & Küntzel, 1989), Ras (Resnick & Racker, 1988), Ira (Tanaka *et al*, 1989, 1990) y la misma adenilato ciclasa (De Vendittis *et al*, 1986). Evidencias recientes indican que el control negativo no actúa, aparentemente, mediante algún mecanismo que afecte la relación GTP/GDP en la proteína Ras (Colombo *et al*, 1998). La bajada rápida del pico de cAMP inducido por glucosa en células desreprimidas es consistente con la idea de la activación de la actividad fosfodiesterasa inducida por PK A. Varias evidencias llevaron a postular este mecanismo. A diferencia de una cepa Ras^{val19} , una cepa

Ras^{val19} pde1Δ pde2Δ posee altísimos niveles de cAMP. Esto indica que las fosfodiesterasas previenen la hiperacumulación de cAMP en la cepa Ras^{val19}. Sin embargo en una cepa con actividad de PK A reducida las fosfodiesterasas no parecen ser capaces de evitarla. Estos resultados son coherentes con la estimulación de la actividad fosfodiesterasa por PK A. La proteína Pde1, antes mencionada ha sido postulada como blanco de fosforilación por PK A para lograr mantener bajos los niveles de cAMP. Se ha encontrado recientemente que la delección de *PDE1*, y no de *PDE2*, provoca una hiperacumulación de cAMP como respuesta a la adición de glucosa o a la acidificación intracelular (Ma *et al*, 1999). La sobreexpresión de *PDE1*, y no de *PDE2*, anula el incremento de cAMP registrado en las condiciones antes mencionadas. Estos resultados indicarían que Pde1, y no Pde2, ejerce un rol específico en el control de la inducción de la señalización por cAMP como resultado de la acción de la glucosa o la acidificación intracelular. Por otra parte existen evidencias que indicarían que Pde2, y no Pde1, sería la responsable de controlar los niveles basales de cAMP durante el crecimiento. La eliminación de un sitio putativo de fosforilación por PK A (Ser 252 -por Ala) en Pde1 resultó en un alelo que parecía tener disminuida su actividad *in vivo*. Aparentemente la fosforilación de Pde1 no cambia su actividad intrínseca o su afinidad por el cAMP, *in vitro*, pero parece ser importante *in vivo* para la interacción proteína-proteína o para dirigirla a alguna localización subcelular específica.

Una vez que la célula llega al estado de estar reprimida por glucosa mediante el "camino principal de represión por glucosa", el sistema sensor de azúcar de los caminos que activan AC es apagado (se postula que es reprimido por glucosa) y un nuevo camino, el camino inducido por crecimiento en medio fermentable (FGM del inglés "Fermentable-Growth-Medium-Induced-Pathway") funciona dándole a las células las mismas características de células con altos niveles de cAMP.

Transducción de señales inducida por combinación de nutrientes: el camino inducido por crecimiento en medio fermentable (FGM)

Cuando se someten células de levaduras a ayuno de nitrógeno, fosfato, sulfato o cualquier otro nutriente esencial, en un medio conteniendo glucosa, éstas se arrestan en fase G_1 del ciclo celular y entran en el estado llamado G_0 . La entrada en G_0 está asociada con la acumulación de glucógeno y trehalosa, represión de genes de proteínas ribosomales, inducción de genes de proteínas heat shock como *SSA3* (que codifica para una Hsp70) y de otros genes como ser *CTT1*, que codifica para la catalasa. La re-adición del nutriente del cual la célula fue privada va a inducir el crecimiento y al mismo tiempo, la pérdida rápida de las características típicas de fase estacionaria. Un ejemplo muy estudiado es el de la rápida activación de la trehalasa frente al agregado de nitrógeno, fosfato o sulfato a un medio carente del correspondiente compuesto conteniendo glucosa. Cabe destacar que esta activación es estrictamente dependiente de la presencia de glucosa (Thevelein, 1994). Thevelein ha propuesto un nuevo camino de transducción de señales que solo sería activado por una combinación de glucosa y todos los otros nutrientes esenciales para el crecimiento. Como resultado de este camino finalmente se activarían las subunidades catalíticas de la PK A de manera independiente de cAMP (Thevelein 1994, Thevelein & Winder, 1999). Hasta el momento los componentes identificados como necesarios para mediar la señalización del camino FGM son los productos de los genes *TPK* y *SCH9*. Este último codifica para una proteína quinasa funcional y estructuralmente relacionada con la subunidad C de la PK A. De estudios recientes en cepas que llevan una delección del gen *SCH9* se encontró que este gen sería el blanco del camino FGM, mas que la subunidad C de la PK A en sí (Crauwels *et al*, 1997). Por otra parte se demostró que no participa de la activación del camino Ras-AC.

Un resumen de los caminos descriptos se muestra en la Tabla 4 y en la Figura 25.

Tabla 4

Principales diferencias entre los caminos de señalización analizados

	Camino de represión por glucosa	Camino de señalización vía adenilato ciclasa	FGM
<i>disparador fisiológico</i>	glucosa (y azúcares rápidamente fermentables)	glucosa (y azúcares rápidamente fermentables) acidificación intracelular	glucosa (y azúcares rápidamente fermentables) + todos los otros componentes requeridos para el crecimiento
requerimiento de fosforilación de glucosa	sí (por Hxk2)	sí (por Hxk1, Hxk2 o Glk1)	no
efecto de nitrógeno	ninguno	ninguno	activa en presencia de glucosa
blanco primario	Cat1/Snf1	Subunidad R de la PK A	SCH9 Subunidad C de PK A (?)
blancos secundarios	Complejo de transcripción Mig1- Ssn6/Cyc8-Tup1 que controla la expresión de genes involucrados en respiración mitocondrial, gluconeogénesis, ciclo del glioxalato y metabolismo de sustratos alternativos	trehalasa, glucógeno sintasa, glucógeno fosforilasa, fosfofructokinasa 2, fructosa-1,6- bifosfatasa, isocitrato liasa, fosfatidilserina sintasa y fosfatidato fosfatasa, Rim15, Pde1. Factores de transcripción como ser Msn2, Msn4, que activan la expresión de genes bajo el control de STRE como ser CTT1, SSA3, UBI4, y Adr1.	Los mismos blancos de los caminos dependientes de cAMP
regulación posible en ausencia del gen BCY1	sí	no	sí
duración del efecto de la señal	permanente (mientras el disparador fisiológico se encuentre presente)	transiente (solo cuando las células no se encuentran reprimidas por glucosa)	permanente (mientras el disparador fisiológico se encuentre presente)

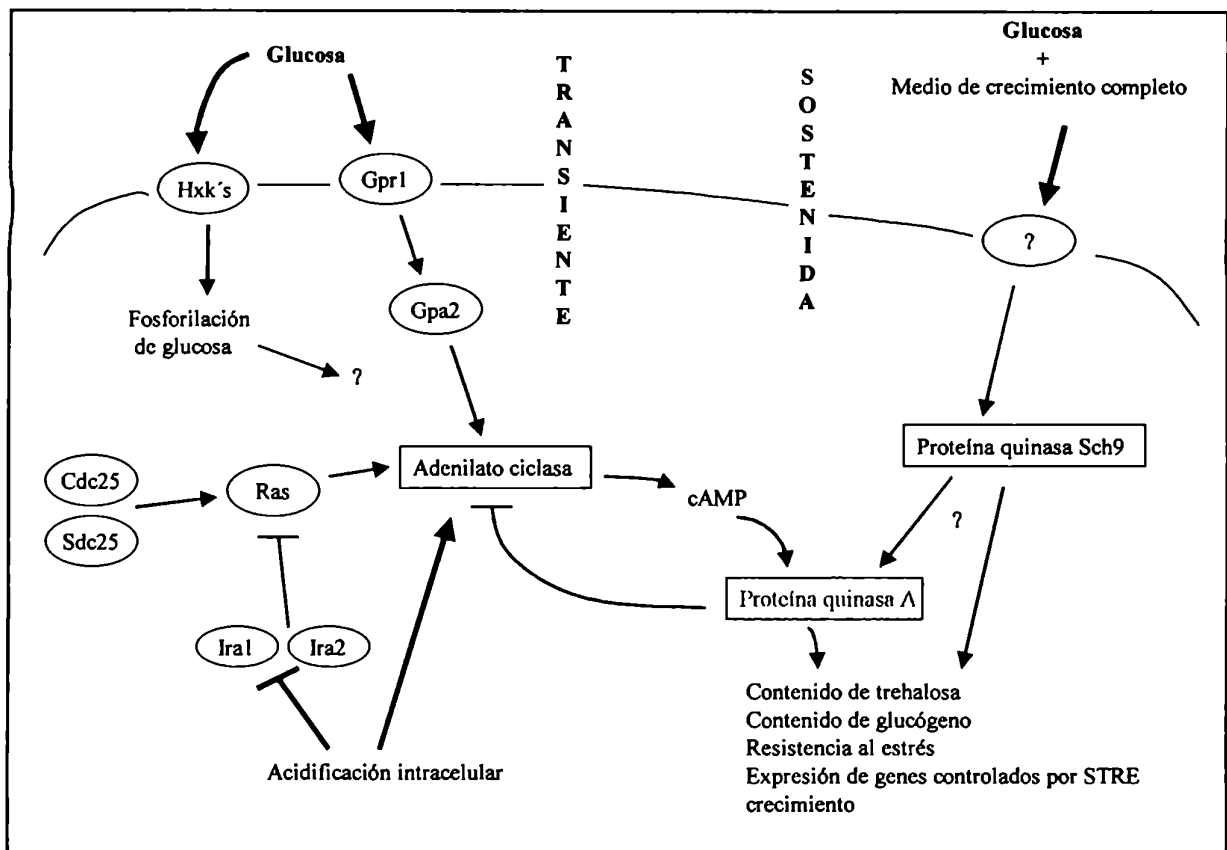


Figura 25- Modelo de las dos vías responsables del control por glucosa de los sustratos-blancos de la PKA

Localización subcelular de la PK A de *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* la PK A parece estar localizada vía su subunidad R (Bcy1p). En células creciendo en fase exponencial, Bcy1p es nuclear, en células creciendo en un medio con fuente no fermentable de carbono se encuentra parcialmente localizada fuera del núcleo y predomina su localización citoplasmática en fase estacionaria (Görner *et al*, 1999). La subunidad C Tpk1p exhibe una distribución celular similar, lo cual es consistente con la propuesta de que Bcy1p actúa como un componente de anclaje de la PK A controlando su localización. Sin embargo Tpk1p se deslocaliza frente a un aumento intracelular de cAMP. Parece no haber un factor similar al PKI en levadura, y en concordancia la subunidad C es más probable que difunda de manera pasiva fuera del núcleo más que sea translocada por transporte activo. La localización de Bcy1p está regulada por su extremo N-terminal.

La principal ventaja de tener predominantemente anclada a la PK A en el núcleo en células creciendo rápidamente, con un ciclo mitótico mas bien corto, sería la de estar lista para regular blancos nucleares cuando la quinasa es activada por cAMP sin la necesidad de que la proteína tenga primero que difundir al núcleo. Esto puede conferirle una importante ventaja selectiva a *S.cerevisiae*, particularmente en el control del crecimiento celular bajo condiciones cambiantes de disponibilidad de nutrientes. Esto puede ser ilustrado por la observación de que la deslocalización de Bcy1p retrasa el reinicio del crecimiento desde fase estacionaria de células tipo-G₀ al agregarles medio fresco.

Linea
esultado

ANTECEDENTES

Reversión de fenotipos *ras2* por mutaciones en el gen *BCY1*

Como se ha mencionado anteriormente, cepas con el camino cAMP-PK A poco activo desarrollan fenotipos característicos. El caso de las cepas que tienen anulado uno de los genes *RAS* es un ejemplo. Las mutantes *ras2::LEU2* son viables aunque no pueden crecer sobre fuentes no fermentables de carbono, hiperacumulan glucógeno, las células diploides esporulan en medio rico (que normalmente es supresivo para células salvajes) y expresan de manera constitutiva genes de proteínas heat shock (Tatchell, 1986; Thevelein, 1992).

Los niveles del mRNA de *RAS1* son sensibles a la fuente de carbono, cayendo a niveles muy bajos en medios conteniendo acetato o etanol (Brevario et al, 1986). Por lo tanto cepas que no poseen el gen *RAS2* son incapaces de crecer sobre este tipo de fuente de carbono dado que presentan una deficiencia en los productos de los genes *RAS* con una disminución concomitante de la actividad de adenilato ciclasa. Supresores de este defecto de crecimiento pueden funcionar tanto por incrementar la expresión de *RAS1* en un medio conteniendo fuente de carbono no fermentable o por reducir los requerimientos por *RAS*. Mediante selección de células *ras2::LEU2* capaces de crecer en fuentes no fermentables de carbono se aislaron revertantes espontáneas de *ras2::LEU2* pertenecientes a cinco grupos de complementación distintos (Cannon et al, 1990). Varios de estos grupos correspondían a mutaciones de proteínas del camino cAMP-PK A. Estos grupos fueron designados SRA (por supresor de RAS). Uno de ellos correspondía a mutaciones del gen *BCY1*, al cual se lo llamó *sra1* (Cannon et al, 1990). Un análisis de secuencia reveló que las mutaciones *bcy1* estaban localizadas en los dominios de unión al cAMP A y B y en el sitio de autofosforilación (Figura 26, Tabla 5). El grupo *sra1* fue el que mostraba el mayor rango de fenotipos distintos. Muchos aspectos del metabolismo se encontraban afectados incluyendo acumulación de glucógeno, capacidad para esporular y capacidad de sobrevivir a condiciones de ayuno. Ninguna mutante mostraba el fenotipo de la cepa *bcy1* nula. En otras palabras, las distintas mutantes *bcy1* revertían de manera **diferencial** los fenotipos asociados a *ras2::LEU2*, dependiendo de cual fuese la mutación en el gen de la subunidad R de la PK A. De esta manera las cepas *bcy1* pueden ser ordenadas en grupos de severidad creciente de acuerdo a la cantidad de aspectos fisiológicos afectados (Tabla 6).

bcy1-14	EQQHTREKTSTPPLPMHFNAQRRTSVSGETLQPNNFDDWT	160
bcy1-15	EQQHTREKTSTPPLPMHFNAQ M RTSVSGETLQPNNFDDWT	160
bcy1-6	EQQHTREKTSTPPLPMHFNAQRRTSVSGETLQPNNFDDWT	160
bcy1-12	EQQHTREKTSTPPLPMHFNAQRRTSVSGETLQPNNFDDWT	160
bcy1-16	EQQHTREKTSTPPLPMHFNAQRRTSVSGETLQPNNFDDWT	160
BCY	EQQHTREKTSTPPLPMHFNAQRRTSVSGETLQPNNFDDWT	160
bcy1-14	PDHYKEKSEQQLQRLEKSIRNNFLFNKLDSDSKRLVINCL	200
bcy1-15	PDHYKEKSEQQLQRLEKSIRNNFLFNKLDSDSKRLVINCL	200
bcy1-6	PDHYKEKSEQQLQRLEKSIRNNFLFNKLDSDSKRLVINCL	200
bcy1-12	PDHYKEKSEQQLQRLEKSIRNNFLFNKLDSDSKRLVINCL	200
bcy1-16	PDHYKEKSEQQLQRLEKSIRNNFLFNKLDSDSKRLVINCL	200
BCY	PDHYKEKSEQQLQRLEKSIRNNFLFNKLDSDSKRLVINCL	200
bcy1-14	EEKSVPGGATIIKQGDQGDYFYVVEKGTVDIFYVNDNKVNS	240
bcy1-15	EEKSVPGGATIIKQGDQGDYFYVVEKGTVDIFYVNDNKVNS	240
bcy1-6	EEKSVPGGATIIKQGDQGDYFYVVEK C TVDFYVNDNKVNS	240
bcy1-12	EEKSVPGGATIIKQGDQGDYFYVVEKGTVDIFYVNDNKVNS	240
bcy1-16	EEKSVPGGATIIKQGDQGDYFYVVEKGTVDIFYVNDNKVNS	240
BCY	EEKSVPGGATIIKQGDQGDYFYVVEKGTVDIFYVNDNKVNS	240
bcy1-14	SGPGSSFGELALMYNSPRAATVVATSDCLLWALDRLTFRK	280
bcy1-15	SGPGSSFGELALMYNSPRAATVVATSDCLLWALDRLTFRK	280
bcy1-6	SGPGSSFGELALMYNSPRAATVVATSDCLLWALDRLTFRK	280
bcy1-12	SGPGSSFGELALMYNSPRAATVVATSDCLLWALDRLTFRK	280
bcy1-16	SGPGSSFGELALMYNSPRAATVVATSDCLLWALDRLTFRK	280
BCY	SGPGSSFGELALMYNSPRAATVVATSDCLLWALDRLTFRK	280
bcy1-14	ILL-----KSMPLVLSLTITYDRAKLADALDT	306
bcy1-15	ILLGSSFKKRLMYDDLKSMPLVLSLTITYDRAKLADALDT	320
bcy1-6	ILLGSSFKKRLMYDDLKSMPLVLSLTITYDRAKLADALDT	320
bcy1-12	ILLGSSFKKRLMYDDLKSMPLVLSLTITYDRAKLADALDT	320
bcy1-16	ILLGSSFKKRLMYDDLKSMPLVLSLTITYDRAKLADALDT	320
BCY	ILLGSSFKKRLMYDDLKSMPLVLSLTITYDRAKLADALDT	320
bcy1-14	KIYQPGETIIREGDQGENFYLYEYGAVDVSKKGQGVINKL	346
bcy1-15	KIYQPGETIIREGDQGENFYLYEYGAVDVSKKGQGVINKL	360
bcy1-6	KIYQPGETIIREGDQGENFYLYEYGAVDVSKKGQGVINKL	360
bcy1-12	KIYQPGETIIREGDQGENFYLYEYGAVDVSKKGQGVINKL	360
bcy1-16	KIYQPGETIIREGDQGENFYLYE-----	343
BCY	KIYQPGETIIREGDQGENFYLYEYGAVDVSKKGQGVINKL	360
bcy1-14	KDHDYFGEVALLNDLPRQATVTATKRTKVATLGKSGFQRL	386
bcy1-15	KDHDYFGEVALLNDLPRQATVTATKRTKVATLGKSGFQRL	400
bcy1-6	KDHDYFGEVALLNDLPRQATVTATKRTKVATLGKSGFQRL	400
bcy1-12	KDHDYFG-----	367
bcy1-16	-----	343
BCY	KDHDYFGEVALLNDLPRQATVTATKRTKVATLGKSGFQRL	400
bcy1-14	LGPVDVVLKLNDPTRH	402
bcy1-15	LGPVDVVLKLNDPTRH	416
bcy1-6	LGPVDVVLKLNDPTRH	416
bcy1-12	-----	367
bcy1-16	-----	343
BCY	LGPVDVVLKLNDPTRH	416

Figura 26- Alineamiento mutantes bcy1. Todas las variantes bcy1 están alineadas desde el aminoácido 120. Se presentan las mutaciones en fucsia, la secuencia de autofosforilación en amarillo, el sitio A en verde y el sitio B en celeste.

-Tabla 5-Mutaciones en las variantes *bcy1*

Alelo <i>bcy1</i>	nucleótido	Cambio en la secuencia	Cambio aminoacídico
6	679	G a T	G227 / C
12	1102	G a T	E368 / Stop (ocre)
13	1034	G a C	G345 / A
14	850-892	delección en marco	delección (G284-L297)
15	425	G a T	R142 / M
16	1032	C a A	Y344 / stop (ocre)

-Tabla 6-Ranking de fenotipos *bcy1*-1.

Genotipos relevantes		acumulación de glucógeno	tolerancia al ayuno	Crecimiento a 37°C	en YPEG a 30°C
<i>BCY1</i>	<i>ras2::LEU2</i>	+++	+	-	-
<i>bcy1-6</i>	<i>ras2::LEU2</i>	+++	+	+	+
<i>bcy1-15</i>	<i>ras2::LEU2</i>	+	+	+	+
<i>bcy1-16</i>	<i>ras2::LEU2</i>	± (37°C)	±	+	+
<i>bcy1-12</i>	<i>ras2::LEU2</i>	-	±	+	+
<i>bcy1-13</i>	<i>ras2::LEU2</i>	-	-	-	+
<i>bcy1-14</i>	<i>ras2::LEU2</i>	-	-	-	+
<i>Δbcy1</i>		-	-	-	-

Todas las mutantes son recesivas, excepto *bcy1-15*, y epistáticas para *ras*.

Estrategia general de la línea 2

Se han propuesto varias hipótesis (Cannon et al, 1986) para explicar la supresión diferencial de fenotipos *ras2::LEU2* de las cepas *bcy1* :

1. sobreexpresión diferencial de C o disminución en los niveles de R de manera de modificar la relación R/C;
2. incremento diferencial de la afinidad de las R mutadas por el cAMP, que llevaría a la activación de la holoenzima a las bajas concentraciones de cAMP presentes en estas células con un fondo *ras2::LEU2*;
3. las mutaciones *bcy1* afectan la estructura terciaria de R de manera tal que reproducen parcialmente los cambios conformacionales promovidos por cAMP en la R salvaje , provocando una disminución diferencial de la afinidad de las R mutadas por C. En esta última hipótesis la naturaleza del sustrato proteico podría estar involucrado en el proceso de activación

El estudio de estas mutantes nos pareció sumamente interesante, dado que al ser la subunidad R la responsable de las diferencias fenotípicas graduales entre ellas, implicaba necesariamente diferencias en el mecanismo de activación en cada caso, *in vivo*. Las cepas utilizadas fueron gentilmente cedidas por el Dr. K Tatchell, de la North Carolina State University.

Para analizar la hipótesis 1 se midieron niveles totales de las subunidades C y R en cada una de la cepas mutantes *bcy1 ras2* así como también la dependencia de sus holoenzimas con el cAMP. Se presentan en este punto consideraciones metodológicas importantes para el análisis de los resultados y el peso de las conclusiones.

Para estudiar el efecto que produce la variación de los niveles de cAMP *in vivo*, se analizaron los fenotipos de las mutantes *bcy1* en un fondo genético normal (*RAS2*) que implica un aumento de los niveles de cAMP intracelulares, y por otra parte los fenotipos de las mutantes *bcy1 ras2* sobreexpresando la fosfodiesterasa de alta afinidad Pde2, donde se espera una disminución de estos niveles, de por sí bajos.

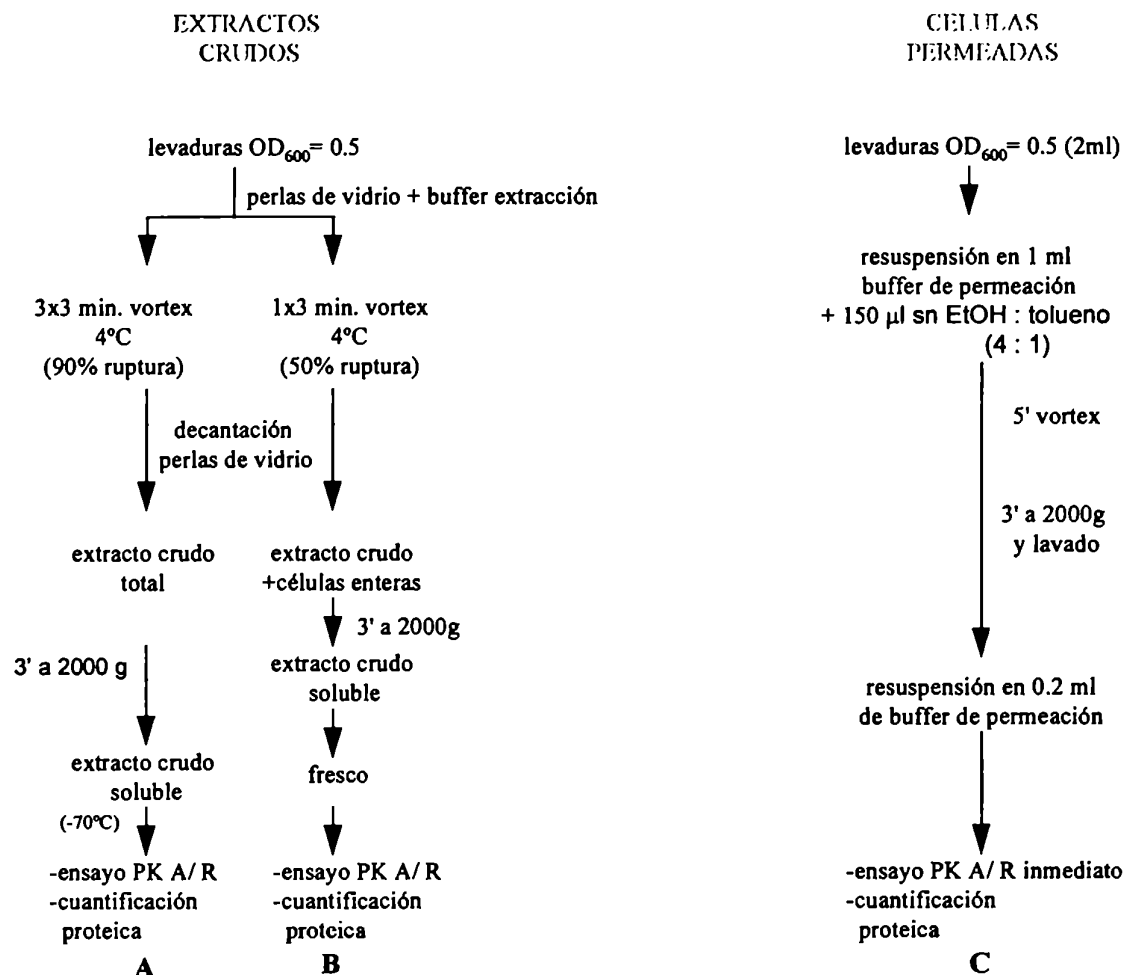
En busca de una caracterización más profunda de estas holoenzimas mutadas se seleccionaron dos (de severidad intermedia y fuerte) y se sobreexpresaron en las correspondientes cepas *bcy1 RAS2 Δpep4* construidas para tal fin. Se confirmó la sobreexpresión de las distintas variantes alélicas de R por distintas técnicas y se analizó el efecto que ésta ejerce en el comportamiento fenotípico de las transformantes. También se analizó el efecto que produce el aumento de la relación R/C en cada caso particular.

Por último se puso a punto un protocolo de semipurificación y se hizo una caracterización bioquímica preliminar de la subunidad R salvaje de *S.cerevisiae* y de las variantes mutadas *bcy1-16* y *bcy1-14*.

Las estrategias llevadas a cabo para el desarrollo de cada una de las construcciones utilizadas en esta sección, así como también el de cepas pertinentes para la transformación con dichas construcciones se encuentran detallados en la Sección II de M & M.

CONSIDERACIONES METODOLOGICAS

Se utilizaron los siguientes abordajes para la puesta a punto de mediciones bioquímicas:



Los resultados obtenidos con cada uno de los tres métodos (A, B y C) se resumen en los siguientes cuadros:

ENSAYO PK A

OBSERVACIONES	A	B	C	posibles causas
<i>dependencia con cAMP</i>			+	<i>Pérdida en A y B por:</i> • <i>proteólisis parcial de R</i> • <i>alta dilución de PK A en el ensayo</i> ↓ <i>disociación espontánea</i> • <i>presencia de altas concentraciones de cAMP en el extracto</i> (tratamiento de las muestras con carbón activado no modifica los resultados)
<i>actividad</i>	<i>baja</i>	<i>> A</i>	<i>≡ B</i>	<i>Baja actividad en A por:</i> • <i>proteólisis</i> • <i>desnaturalización mecánica</i>

ENSAYO UNION A cAMP (R)

OBSERVACIONES	A	B	C	posibles causas
<i>unión a cAMP</i>	<i>wt +</i> <i>ras2 +</i> <i>bcy1-15 +</i> <i>resto:</i> <i>indetectable</i>	<i>todas +</i> <i>ras2 >A</i> <i>wt y bcy1-15</i> <i>idem A</i>	<i>indetectable</i>	<i>Falta de detección en permeadas: la concentración efectiva de cAMP en las células sería muy inferior a lo puesto.</i> en A <i>por baja concentración de cAMP y baja cantidad de proteína ensayada.</i>
<i>concentración de cAMP</i>	<i>0.3 y 1 µM</i>	<i>1 y 3 µM</i>	<i>3 µM</i>	
<i>µg de proteína soluble ensayados</i>	<i>20 y 40</i>	<i>40 y 80</i>	<i>20 y 40</i>	

A continuación se analizan las ventajas y desventajas que presenta cada una de estas metodologías, en base a los resultados obtenidos:

	VENTAJAS	DESVENTAJAS
A	* ruptura total	* disminución actividad R y C por proteólisis o desnaturalización mecánica * no hay dependencia con cAMP * extracto congelado
B	* aumenta actividad por tratamiento menos agresivo que A * se mide actividad total de C * se evita posible destrucción por congelamiento	* ruptura parcial * no hay dependencia con cAMP
C	* refleja interacciones intracelulares in vivo * tratamiento suave * se observa dependencia con cAMP	* no se garantiza la medición de actividad total (ej: interacción con inhibidores) * se necesitan altas concentraciones de [^3H]cAMP en la mezcla de incubación para llegar a niveles saturantes por célula (ensayo unión cAMP), y este compuesto tiene un alto costo.

De acuerdo a lo mostrado en esta tabla se tomará:

-método B para medir niveles de PK A

-método B para medir niveles de R

-método C para medir grado de activación de PK A

RESULTADOS

Niveles totales de C y R en las mutantes *bcy1 ras2*

De acuerdo a lo discutido anteriormente, las actividades de C y R fueron medidas en extractos crudos de seis cepas *bcy1 ras2::LEU2* y en la cepa salvaje con la intención de estimar la relación R/C (Tabla 7).

Los niveles de C fueron estimados por la medición de actividad quinasa dependiente de kemptido en presencia de cAMP. Para asegurar que la cinética del ensayo de PK A fuera lineal, se tuvieron que utilizar altas diluciones de enzima. Cabe destacar en este punto que como se ha mencionado anteriormente la afinidad de la interacción R/C en levaduras es mucho menor que en las enzimas de eucariontes superiores. Habiéndose determinado un IC_{50} de 40 nM para la inhibición de C por R de *S.cerevisiae* (Kuret et al, 1988) es de esperar que en las condiciones de ensayo, donde se estima una concentración subnanomolar de enzima, ésta se encuentre disociada de manera espontánea y resulte independiente de la activación por cAMP.

Tabla 7. Niveles de subunidades de la PK A. Los niveles de R y C fueron medidos en alícuotas de células en crecimiento exponencial. Los valores representan las medias $\pm$ SD de extractos separados. Los valores para la cepa salvaje de actividad C (0.25 U/mg), de unión de cAMP a R (10 pmoles/mg) y la relación R/C (40 pmoles/ U) fueron tomados como 1. Los demás valores son relativos a los de la cepa wt. Los valores entre paréntesis corresponden al total de sitios putativos de unión de cAMP en las mutantes que tienen solo un sitio.

Cepa	actividad relativa de C	actividad relativa de unión de cAMP a R	relación R/C relativa
salvaje (wt)	1	1	1
ras2	1.9 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.2	1.1
bcy1-6	1.5 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.3
bcy1-15	0.7 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.2
bcy1-16	0.7 $\pm$ 0.1	0.5 (1) $\pm$ 0.1	1.4 ^a
bcy1-12	0.7 $\pm$ 0.1	0.35 (0.7) $\pm$ 0.1	1.0 ^a
bcy1-13	0.6 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	1.3
bcy1-14	0.7 $\pm$ 0.1	1.4 $\pm$ 0.1	2

^a relaciones R/C relativas calculadas teniendo en cuenta los sitios de unión de cAMP putativos.

De los datos de la Tabla 7, donde la actividad específica de C para cada cepa está expresada como valor relativo, se puede observar que los niveles de C para las mutantes *bcy1* oscilaron entre 0.6 a 1.9 veces el valor de la cepa wt. Las actividades

detectadas fueron absolutamente dependientes de la adición de kemptido, lo que sugiere que la actividad medida corresponde a la actividad de PK A. Las únicas cepas que mostraron una actividad mayor a la de la wt fueron la cepa parental *ras2* y la cepa *bcy1-6*.

Los niveles de R fueron estimados por el ensayo de unión a [3 H]cAMP, según se describe en Materiales y Métodos . La capacidad de unión para la cepa wt, parental y *bcy1-15* alcanzó la saturación a 0.3 μ M, mientras que para las otras cepas *bcy1* la unión de cAMP se fue incrementado en el rango 0.3-3 μ M sin llegar a la saturación. Por lo tanto 3 μ M fue la concentración elegida para medir la capacidad de unión de [3 H]cAMP de las diferentes cepas, aunque en muchas de ellas la capacidad esté subestimada. En la Tabla 7 se muestran las cantidades relativas de cAMP unido de manera específica a cAMP 3 μ M.

Para obtener un dato más preciso de los niveles de R en las cepas *bcy1-16* y *bcy1-12* se duplicaron los valores de actividades obtenidos ya que las mutaciones correspondientes indican la pérdida del sitio B de unión a cAMP. Dado que las actividades de R en las mutantes estarían subestimadas, también lo estarían las relaciones R/C. Sin embargo, excepto para la mutante *bcy1-6*, esta observación no afecta la conclusión que surge de estos resultados ya que todas estas relaciones son mayores que la observada para la cepa salvaje.

Si suponemos que en la cepa salvaje no hay exceso de R libre, una relación R/C relativa mayor que 1 (uno) implica que no hay exceso de C frente a R. En la cepa *bcy1-6* la relación R/C de 0.3 podría reflejar dicho exceso o bien una severa subestimación de los niveles de R debido a las limitaciones del ensayo de unión de cAMP.

De estos datos surgen dos conclusiones: no hay un exceso de subunidad C libre en las mutantes *bcy1* (con la posible excepción de la cepa *bcy1-6*) y la afinidad de las subunidades mutadas por el cAMP no está incrementada. Por el contrario, para la mayoría de las R mutadas se observa una disminución significativa de la afinidad por el cAMP, excepto para la variante *bcy1-15* que se comporta igual que la R nativa, ya que la mutación no compromete los sitios de unión al cAMP, sino la zona de autofosforilación (Arg142 cercana al sitio de autofosforilación está reemplazada por Met).

En la cepa parental *ras2::LEU2* los niveles de C están aumentados comparados con los de la cepa salvaje. Es probable que este incremento refleje un mecanismo de compensación presente dentro de la célula asociado a una respuesta a bajos niveles de cAMP (como es el caso de la falta de *ras2*). Existen antecedentes que indican que los niveles de R aumentan como compensación de la sobreexpresión de C en sistemas

animales (McKnight, 1991). En la cepa *ras2::LEU2* el aumento de dos veces en los niveles de C está acompañado por un aumento equivalente de los niveles de R, por lo que la relación R/C se mantiene igual a la encontrada en la cepa salvaje.

Dependencia de la actividad de PK A con cAMP

Como se indicó en “ consideraciones metodológicas”, para estimar la dependencia de la PK A con el cAMP se midió actividad quinasa en células permeadas. Después de la permeabilización pequeñas moléculas como el kemptido, ATP y cAMP pueden desplazarse libremente dentro y fuera de la célula mientras que las macromoléculas no pueden ser liberadas de las organelas celulares manteniendo su integridad y localización (Kessler, 1991). Por lo tanto la medición de una actividad enzimática en este sistema refleja la actividad dentro de cada célula, preservándose su modulación por otras macromoléculas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la enzima de *Mucor rouxii*, en la primera parte de esta Tesis, es de esperar que a la alta concentración intracelular en que se encuentra la PK A (del orden de μM) los valores no reflejen los correspondientes a la actividad total. La Figura 27 muestra los resultados obtenidos en ausencia y presencia de cAMP. Los niveles relativos de actividad catalítica son similares a los observados en extractos crudos (Tabla 7). La actividad PK A en células salvajes y en la cepa parental *ras2::LEU2* es dependiente de cAMP de manera casi absoluta, mientras que en las variantes mutadas *bcy1* la dependencia es parcial. La actividad quinasa de kemptido independiente de cAMP fue sugerida previamente para algunas mutantes *bcy1* (Cannon et al, 1990). Se puede establecer una correlación aproximada entre la relación de actividades (-/+ cAMP) y la severidad de la mutación *bcy1*. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que en las mutantes *bcy1*, R interacciona con C para formar variantes de holoenzima que estarían parcialmente inhibidas por R.

Las relaciones de actividad en ausencia y presencia de cAMP en las mutantes *bcy1* con fondo *RAS2* fueron similares a los mostrados en la Fig. 27.

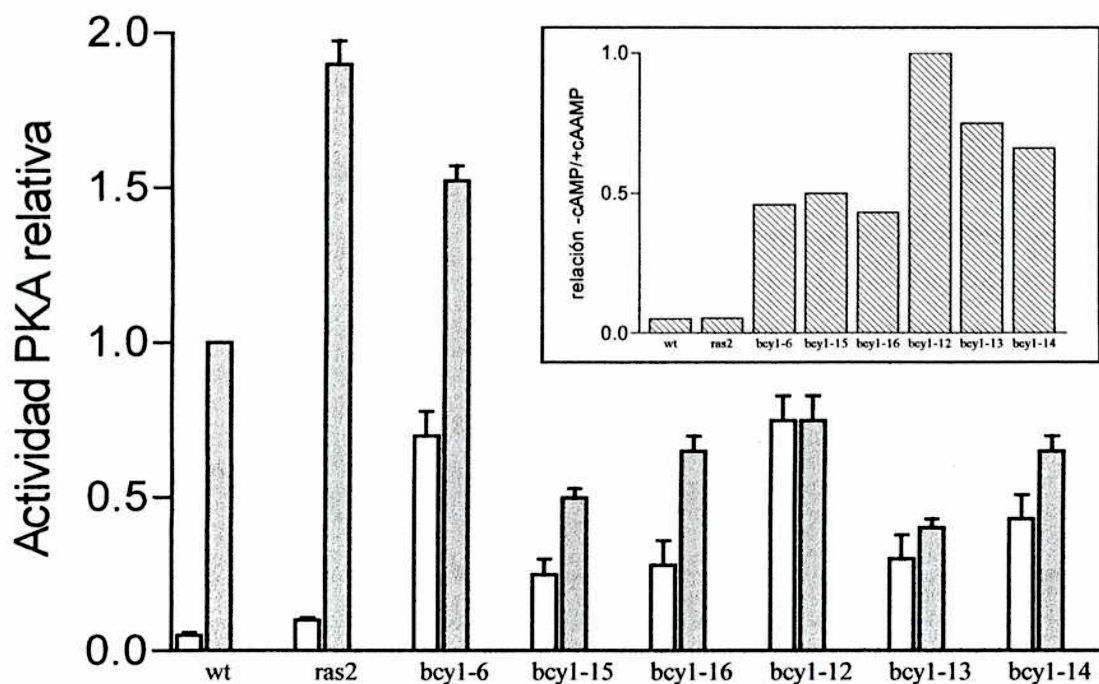


Figura 27-Dependencia de la actividad de PK A con cAMP en células permeadas. Se midió actividad quinasa dependiente de kemptido, en muestras de células permeabilizadas (20 μ g de proteína) bajo condiciones de ensayo standards en ausencia (barras blancas) o presencia (barras grises) de cAMP 10 μ M. Los valores están expresados relativos a los de la cepa salvaje (wt) en presencia de cAMP (0.55U/mg). El recuadro muestra las relaciones de actividad -/+ cAMP para cada cepa.

Fenotipos de mutantes *bcy1* en fondos genéticos *ras2::LEU2* y *RAS2*

Como se ha mencionado anteriormente las cepas que llevan la mutación *ras2::LEU2* presentan tres defectos típicos: acumulan niveles de glucógeno mayores que una cepa salvaje, células diploides homocigotas esporulan en medio rico y no pueden crecer sobre fuentes no fermentables de carbono (Tatchell, 1986; Thevelein, 1992). Este último defecto fue utilizado por el grupo del Dr Tatchell para seleccionar las mutantes *bcy1* usadas en este trabajo. En un primer paso de estrategia de Tesis, se analizaron los fenotipos de las cepas *bcy1* en un fondo genético *RAS2* (wt), donde los niveles de cAMP son más altos dado que la proteína Ras2 es funcional (Figura 28). El orden de severidad no varía con respecto a las cepas *ras2::LEU2*. Sin embargo, se observó que la severidad de cada mutante en el fondo wt es mayor que en su contraparte *ras2*. Por ejemplo, *bcy1-16* que poseía niveles normales de glucógeno, exhibe una deficiencia parcial en un fondo *RAS2*; *bcy1-14* que era capaz de crecer sobre fuentes no fermentables de carbono en un fondo *ras2* no es capaz de hacerlo en uno *RAS2*. A modo de comparación se presentan los resultados en la tabla de fenotipos (Tabla 7). Estos resultados sugieren que la severidad relativa de las mutantes,

es una propiedad conferida por las R mutadas y que la normalización de la actividad del camino del cAMP en el fondo *RAS2* es responsable del incremento en la severidad fenotípica dentro de cada mutante *bcy1*.

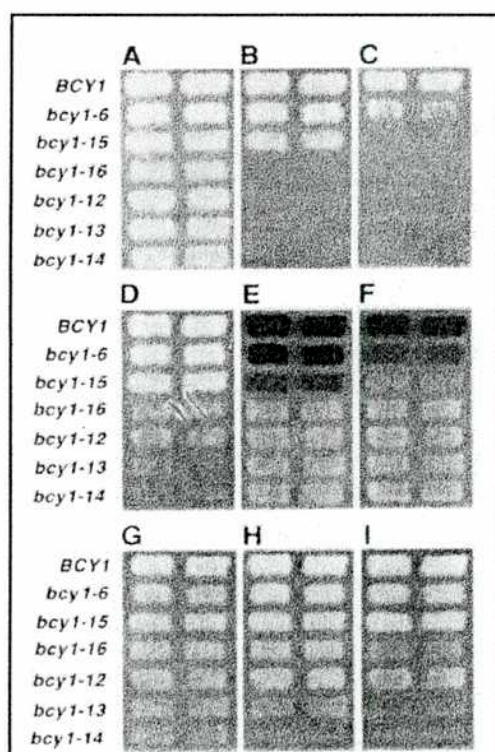


Figura 28-Fenotipos de las mutantes *bcy1* / *Ras2*.-Las cepas *bcy1 ras2::LEU2* fueron cruzadas con una cepa isogénica *Ras2* y los productos meióticos *bcy1*/ *Ras2* fueron sembrados en una placa madre seguido de réplica en placas que fueron tratadas como se detalla a continuación: (A), crecimiento en medio YPD, (B) incubación 1 min a 57 °C seguido de crecimiento en medio A, (C) incubación 16 min a 57 °C seguido de crecimiento en medio A, (D) incubación en un medio deficiente de sulfato por 30 horas seguido de réplica en una placa con medio YPD, (E) crecimiento en medio YPD a 30 °C seguido de tinción con vapor de yodo, (F) crecimiento en medio YPD a 37 °C seguido de tinción con vapor de yodo, (G) crecimiento en medio YPEG a 24 °C, (H) crecimiento en medio YPEG a 30 °C, (I) crecimiento en medio YPEG a 37 °C. Se analizaron dos cepas de cada genotipo. Las placas fueron incubadas por tres días antes de ser fotografiadas.

Tabla 7- Ranking de fenotipos de cepas *bcy1 ras2* y *RAS2*

Genotipos relevantes		acumulación de glucógeno	tolerancia al ayuno	Crecimiento a 37°C	en YPEG a 30°C
BCY1	<i>ras2::LEU2</i>	+++	+	-	-
BCY1	<i>RAS2</i>	++	+	+	+
<i>bcy1-6</i>	<i>ras2::LEU2</i>	+++	+	+	+
<i>bcy1-6</i>	<i>RAS2</i>	++ (30°C) + (37°C)	+	+	+
<i>bcy1-15</i>	<i>ras2::LEU2</i>	+	+	+	+
<i>bcy1-15</i>	<i>RAS2</i>	+(30°C)	+	+	+
<i>bcy1-16</i>	<i>ras2::LEU2</i>	± (37°C)	±	+	+
<i>bcy1-12</i>	<i>ras2::LEU2</i>	-	±	+	+
<i>bcy1-13</i>	<i>ras2::LEU2</i>	-	-	-	+
<i>bcy1-14</i>	<i>ras2::LEU2</i>	-	-	-	+
<i>bcy1-12</i>	<i>RAS2</i>	-	-	-	±
<i>bcy1-16</i>	<i>RAS2</i>	-	-	-	±
<i>bcy1-13</i>	<i>RAS2</i>	-	-	-	-
<i>bcy1-14</i>	<i>RAS2</i>	-	-	-	-
$\Delta bcy1$		-	-	-	-

Sobreexpresión de la fosfodiesterasa de alta afinidad (*PDE2*)

Las cepas *bcy1 ras2::LEU2* poseen niveles de cAMP adecuados como para vivir, ya que contienen el gen *RAS1*, parcialmente redundante y la adenilato ciclasa es funcional. Para analizar si en la cepas *bcy1* las holoenzimas se podrían encontrar parcialmente activadas, estudiamos el efecto que una disminución de los niveles de cAMP provoca sobre los fenotipos asociados a PK A en estas cepas.

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta ahora suponíamos que una disminución de los niveles de cAMP no afectaría los fenotipos de las cepas *bcy1*. Las cepas salvaje, parental *ras2::LEU2* y cada una de las *bcy1* fueron transformadas con el vector de alto número de copia pRS426 (*URA3*) conteniendo el gen *PDE2* (pRS426-*PDE2*) que codifica para la fosfodiesterasa de alta afinidad (ver construcción en Estrategia de clonado, M&M). En todos los casos se obtuvieron transformantes *URA*⁺ que sobreexpresaban Pde2 (Tabla 8) excepto para las cepas parental *ras2::LEU2* y mutante *bcy1-6*, en las que no se pudieron aislar transformantes. Sin embargo ambas cepas fueron capaces de dar transformantes en un fondo normal *RAS2*.

Tabla 8. Niveles de expresión de fosfodiesterasa. Los valores representan la media de la actividad registrada en tres colonias independientes

Actividad fosfodiesterasa en cepas que llevan el plásmido		
Cepa	pRS426	pRS426-PDE2
	U/mg	
bcy1-15	24 ± 1.5	215 ± 14
bcy1-16	42 ± 5	944 ± 148
bcy1-12	47 ± 4	188 ± 32
bcy1-14	6 ± 0.7	54 ± 4
bcy1-13	38 ± 3	109 ± 16

A continuación se realizó un análisis fenotípico de las células que sobreexpresaban *PDE2*: acumulación de glucógeno, viabilidad y crecimiento sobre fuentes no fermentables de carbono a 30°C y 37°C. No se encontró ninguna diferencia fenotípica entre las células que sobreexpresan *PDE2* y sus contrapartes transformadas con el vector solo. Estos resultados indican que una disminución en los niveles de cAMP no tiene efecto en el comportamiento fenotípico de las mutantes *bcy1*. Sin embargo, *bcy1-6* en un fondo *RAS2* sobreexpresando *PDE2* mostró un incremento en los niveles de glucógeno, como era esperable (Tabla 9)

Con respecto a la falta de transformantes observada en el caso de las cepas *ras2::LEU2* parental y mutante *bcy1-6* (la más suave de las revertantes *ras2::LEU2*) es probable que disminuir aún más los niveles de cAMP que de por sí ya deben ser bajos en estas cepas, resulte en un arresto del crecimiento asociado a la pérdida total de actividad PK A. Esta deficiencia es anulada por la restauración de un gen *RAS2* funcional. Se ha descrito el mismo comportamiento para células *cyr1*, que poseen una adenilato ciclasa no funcional, y que por lo tanto dependen de la presencia de cAMP en el medio para poder crecer (Matsumoto et al, 1982).

Tabla 9-Ranking de fenotipos de cepas *bcy1* (*ras2*, *RAS2*) y efectos debido a sobreexpresión de *PDE2*

Genotipos relevantes			acumulación de glucógeno	tolerancia al ayuno	Crecimiento a 37°C	en YPEG a 30°C
BCY1	<i>ras2::LEU2</i>		+++	+	-	-
BCY1	<i>ras2::LEU2</i>	<i>PDE2*</i>		no viable		
BCY1	<i>RAS2</i>		++	+	+	+
BCY1	<i>RAS2</i>	<i>PDE2*</i>	++	nd	+	+
<i>bcy1-6</i>	<i>ras2::LEU2</i>		+++	+	+	+
<i>bcy1-6</i>	<i>ras2::LEU2</i>	<i>PDE2*</i>		no viable		
<i>bcy1-6</i>	<i>RAS2</i>	<i>PDE2*</i>	+++ (30°C)	nd	+	+
			++ (37°C)			
<i>bcy1-6</i>	<i>RAS2</i>		++ (30°C)	+	+	+
			+ (37°C)			
<i>bcy1-15</i>	<i>ras2::LEU2</i>		+	+	+	+
<i>bcy1-15</i>	<i>ras2::LEU2</i>	<i>PDE2*</i>	+	nd	+	+
<i>bcy1-15</i>	<i>RAS2</i>		+ (30°C)	+	+	+
<i>bcy1-16</i>	<i>ras2::LEU2</i>		± (37°C)	±	+	+
<i>bcy1-16</i>	<i>ras2::LEU2</i>	<i>PDE2*</i>	-	nd	+	+
<i>bcy1-12</i>	<i>ras2::LEU2</i>		-	±	+	+
<i>bcy1-12</i>	<i>ras2::LEU2</i>	<i>PDE2*</i>	-	nd	+	+
<i>bcy1-13</i>	<i>ras2::LEU2</i>		-	-	-	+
<i>bcy1-13</i>	<i>ras2::LEU2</i>	<i>PDE2*</i>	-	nd	-	+
<i>bcy1-14</i>	<i>ras2::LEU2</i>		-	-	-	+
<i>bcy1-14</i>	<i>ras2::LEU2</i>	<i>PDE2*</i>	-	nd	-	+
<i>bcy1-12</i>	<i>RAS2</i>		-	-	-	±
<i>bcy1-16</i>	<i>RAS2</i>		-	-	-	±
<i>bcy1-13</i>	<i>RAS2</i>		-	-	-	-
<i>bcy1-14</i>	<i>RAS2</i>		-	-	-	-
$\Delta bcy1$			-	-	-	-

* sobreexpresión
nd -no determinado

Se puede concluir que las holoenzimas mutadas permiten saltar el efecto letal que la sobreexpresión del gen *PDE2* provoca en un fondo genético *ras2*. La única mutante que forma una holoenzima incapaz de sortear este efecto es *bcy1-6*, lo que concuerda con ser la menos severa de las mutantes *bcy1* y la única que no es *RAS* independiente ya que no puede sobrevivir a la doble mutación *ras1-ras2* (Cannon et al, 1990).

Sobreexpresión de la subunidad regulatoria salvaje y las variantes *bcy1* en las cepas de *S.cerevisiae* correspondientes.

No es fácil la preparación de las holoenzimas mutadas ya que como la afinidad entre las subunidades R y C está muy disminuida tienden a disociarse espontáneamente por dilución, como ocurre al usar gradientes de sacarosa. Mientras

que con esta técnica la holoenzima salvaje es capaz de mantenerse como tal observándose un pico de actividad PK A dependiente de cAMP no ocurre lo mismo con las variantes mutadas, siendo imposible detectar actividad quinasa, probablemente porque al disociarse no puede preservarse la integridad de la subunidad C. Como contraparte se ha podido detectar cierto grado de dependencia con cAMP en varias variantes *bcy1* después de utilizar una técnica que concentra, como es la precipitación con sulfato de amonio.

Con el objetivo de purificar las distintas variantes *bcy1* para una posterior caracterización bioquímica se utilizó el siguiente abordaje:

- 1) sobreexpresión inducible de cada mutante *bcy1* en las cepas con el fondo genético correspondiente (*bcy1 RAS2*) y con baja actividad de proteasas (*Δpep4*), de manera de preservar las proteínas de interés en los pasos posteriores de purificación. La estrategia de clonado y la construcción de estas cepas se encuentra detallada en la Sección II de M & M y esquematizado en el punto siguiente.
- 2) purificación parcial de extractos por precipitación diferencial con sulfato de amonio (método que tiende a concentrar y no a diluir) y desalado de las preparaciones por Sephadex G-25 inmediatamente antes de los ensayos;

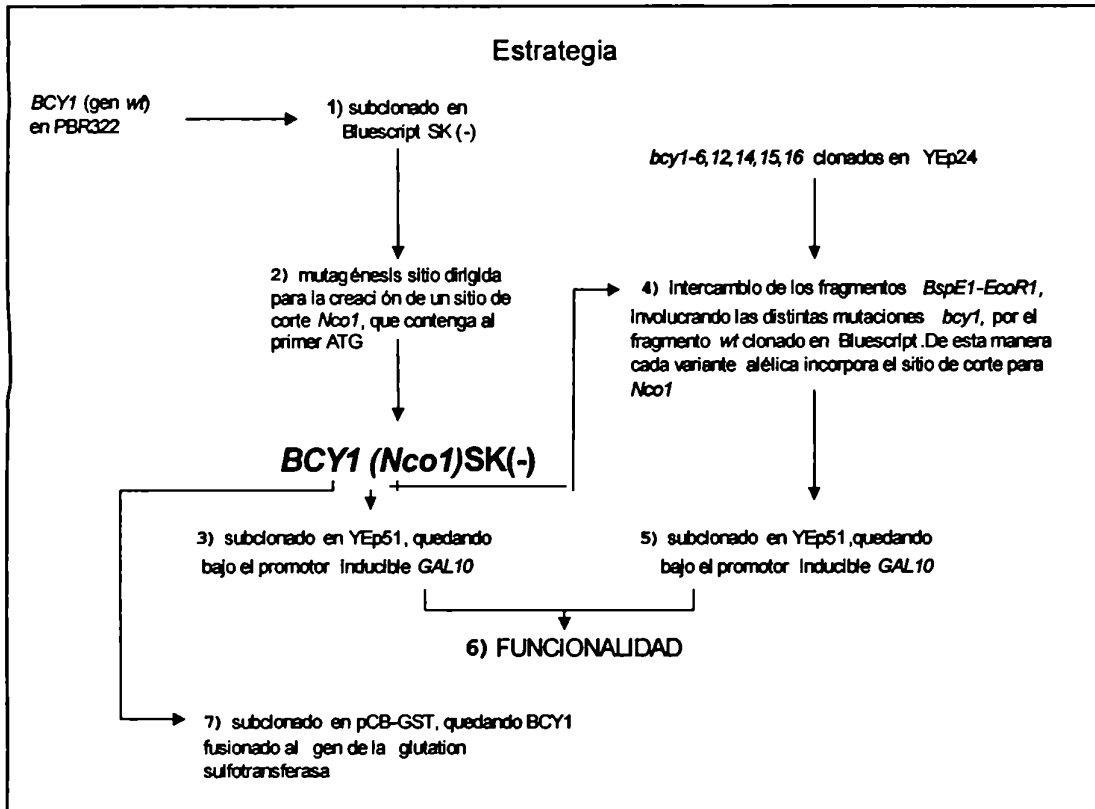
En el marco de esta Tesis se prepararon las herramientas para la reconstrucción de holoenzimas mutadas *in vitro* con subunidad C purificada y exceso de R (ver M & M), pero la concreción de este abordaje experimental es tema de la Tesis Doctoral de la Lic. Paula Portela.

Estrategia de clonado de cada variante *bcy1* en vectores de expresión en levaduras

Se diseñó una estrategia de clonado (Esquema 1) para lograr los siguientes objetivos:

- Subclonar el gen *BCY1* salvaje y las variantes alélicas mutadas *bcy1* en un vector shuttle (levadura-*E.coli*) de manera tal que su expresión sea inducible en levadura. El vector elegido fue el YEp51, de alto número de copia y que posee el promotor GAL10 (que responde a la presencia de galactosa en el medio) río arriba del sitio de clonado *Nco1*.
- Subclonado del gen *BCY1* salvaje en el vector pCB-GST de manera tal que la subunidad regulatoria quede fusionada a la GST. Esta construcción se usará para la purificación de subunidades C, en una etapa posterior a esta Tesis.

Para generar el sitio *Nco1* en *BCY1* de manera tal que comprometa al primer AUG, se realizó una mutagénesis sitio dirigida. Por otra parte, las variantes mutadas *bcy1* fueron subclonadas en Bluescript SK. Posteriormente el fragmento *BspE1-EcoR1*, de cada una de las variantes mutadas, fue intercambiado en la construcción *BCY1(Nco1)-BluSK*. Finalmente, tanto el gen salvaje como las versiones mutadas fueron introducidos en el vector shuttle elegido. Se construyeron también cepas *bcy1 Δpep4* receptoras, pertinentes para cada construcción.



Sobreexpresión de la subunidad R salvaje, *bcy1-16* y *bcy1-14*

Se seleccionaron las variantes *bcy1-16* y *bcy1-14*, de severidad intermedia y alta respectivamente, para desarrollar los estudios siguientes.

Se transformaron las cepas isogénicas 1115-1a (salvaje) 1449 (*bcy1-16*) y 1451 (*bcy1-14*) con las construcciones YEp51-*BCY1*, YEp51-*bcy1-16* y YEp51-*bcy1-14*, respectivamente, o con el vector sin inserto. Como ha sido detallado en Estrategia de clonado, los alelos *bcy1* y el gen nativo quedan bajo el promotor *GAL10* inducible por galactosa y reprimible por glucosa.

En todos los casos se obtuvieron transformantes LEU⁺, con alta eficiencia. Para una primera selección se tomaron 8 colonias independientes de cada transformación y se analizaron los niveles de glucógeno por tinción con vapores de I₂ en placas YPD y placas YPgal (medio inductor). En todos los casos las colonias transformadas con las construcciones que llevaban el gen *BCY1* o las variantes mutadas *bcy1* mostraron una mayor acumulación de glucógeno respecto de sus controles. Se seleccionaron, posteriormente, dos colonias representativas de cada transformación para analizar los niveles de R en cada caso. Esto se llevó a cabo mediante análisis de muestras semipurificadas por medición de actividad de unión a [³H]cAMP, corrida en SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie blue, Western blot, y análisis fenotípico.

Determinación de actividad ligante de [³H]cAMP

Se midieron a continuación los niveles de R mediante el ensayo de capacidad de unión de [³H]cAMP (Tabla 10). Todas las transformantes fueron crecidas en medio inductor con galactosa y las muestras fueron semipurificadas como se indica en M&M. Como se puede observar en todos los casos hay sobreexpresión de R, aumentando los niveles dos órdenes de magnitud respecto de los valores basales. Estos mismos valores basales se registran en todas las cepas cuando son crecidas en glucosa.

Tabla 10. Niveles de R. Los niveles de R fueron medidos en alícuotas de mas semipurificadas (ver M&M) de células en crecimiento exponencial (17 horas) en medio inductor con galactosa. Los valores representan las medias $\pm$ SD de muestras independientes

cepa	Capacidad unión [³ H]cAMP (pmoles/mg prot.)
wt(YEp51)	1.9 $\pm$ 0.6
wt(YEp51-BCY1)	178.2 $\pm$ 2.8
16(YEp51)	2.9 $\pm$ 1.3
16(YEp51-bcy1-16)	121 $\pm$ 29
14(YEp51)	1.8 $\pm$ 0.9
14(YEp51-bcy1-14)	103 $\pm$ 19.3

Análisis por SDS-PAGE / tinción con Coomassie blue y Western-blot

La sobreexpresión de la R salvaje y las dos mutantes *bcy1-16* y *bcy1-14* fue visualizada por SDS-PAGE y Western-blot (Figura 29).

La sobreexpresión es tal que ya se pueden observar las bandas por tinción con Coomassie blue (Figura 29 A), corroborándose la naturaleza de las mismas al revelar el Western blot (Figura 29 B) con un anticuerpo específico dirigido contra la porción amino terminal (primeros 19 aminoácidos) región conservada en todas las mutantes. Los PM encontrados fueron de 59 kD, 48 kD, 55 kD, para R salvaje, bcy1-16 y bcy1-14 respectivamente. Las diferencias en los PM coinciden con las esperadas.

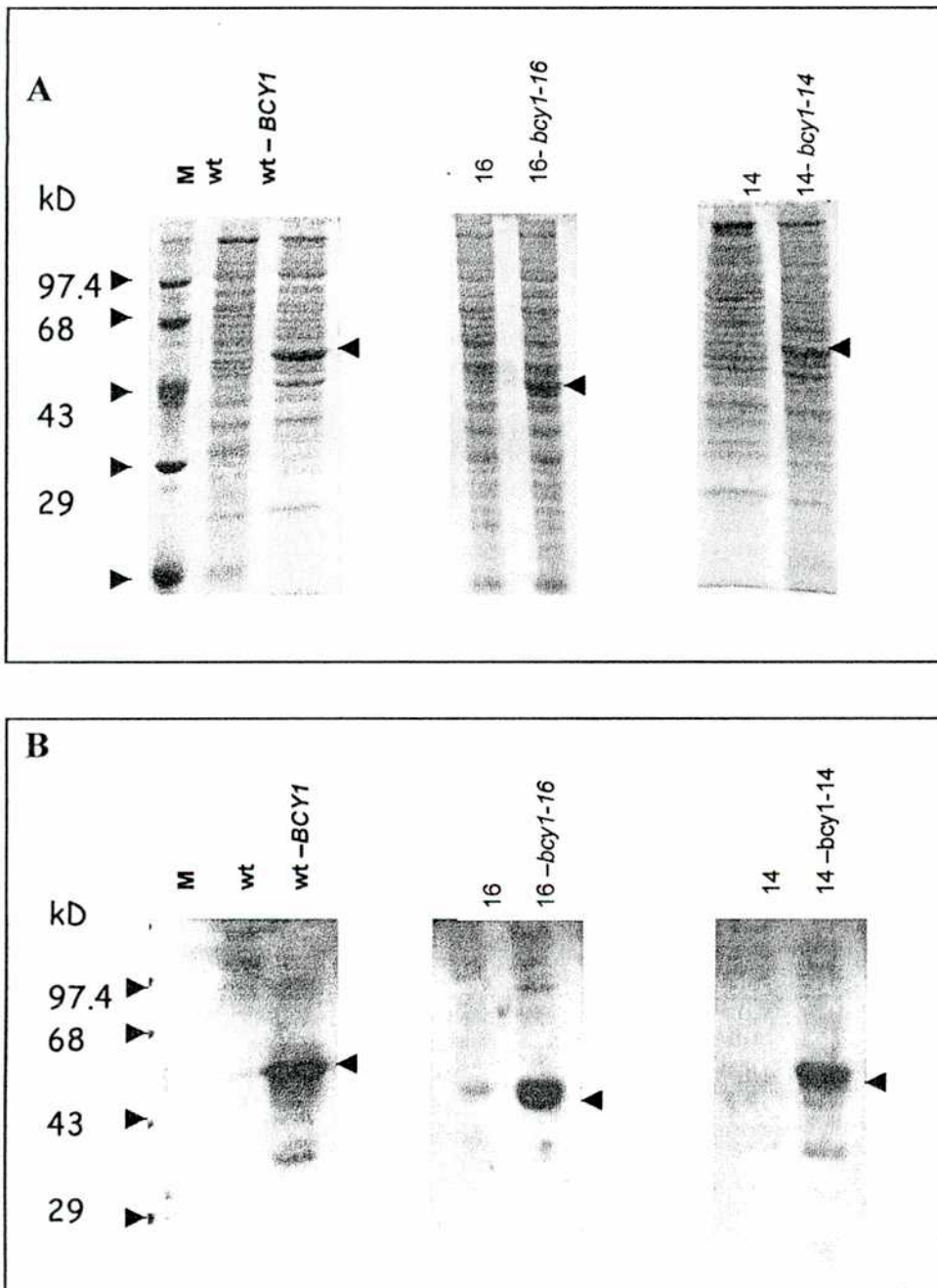


Figura 29. Análisis de la sobreexpresión de Rwt, R16 y R14. (A) SDS-Page 10% y posterior tinción con Coomassie blue.. Se sembró en cada calle 15 µg de proteína total. (B) Western blot del mismo gel utilizando anticuerpos específicos contra R de *S. cerevisiae*. M, marcadores de PM; wt = wt YEp51; wt-BCY1 = wt YEp51-BCY1; 16 = 16 YEp51; 16-bcy1 = 16 YEp51-bcy1-16; 14 = 14 YEp51; 14-bcy1 = 14 YEp51-bcy1-14.

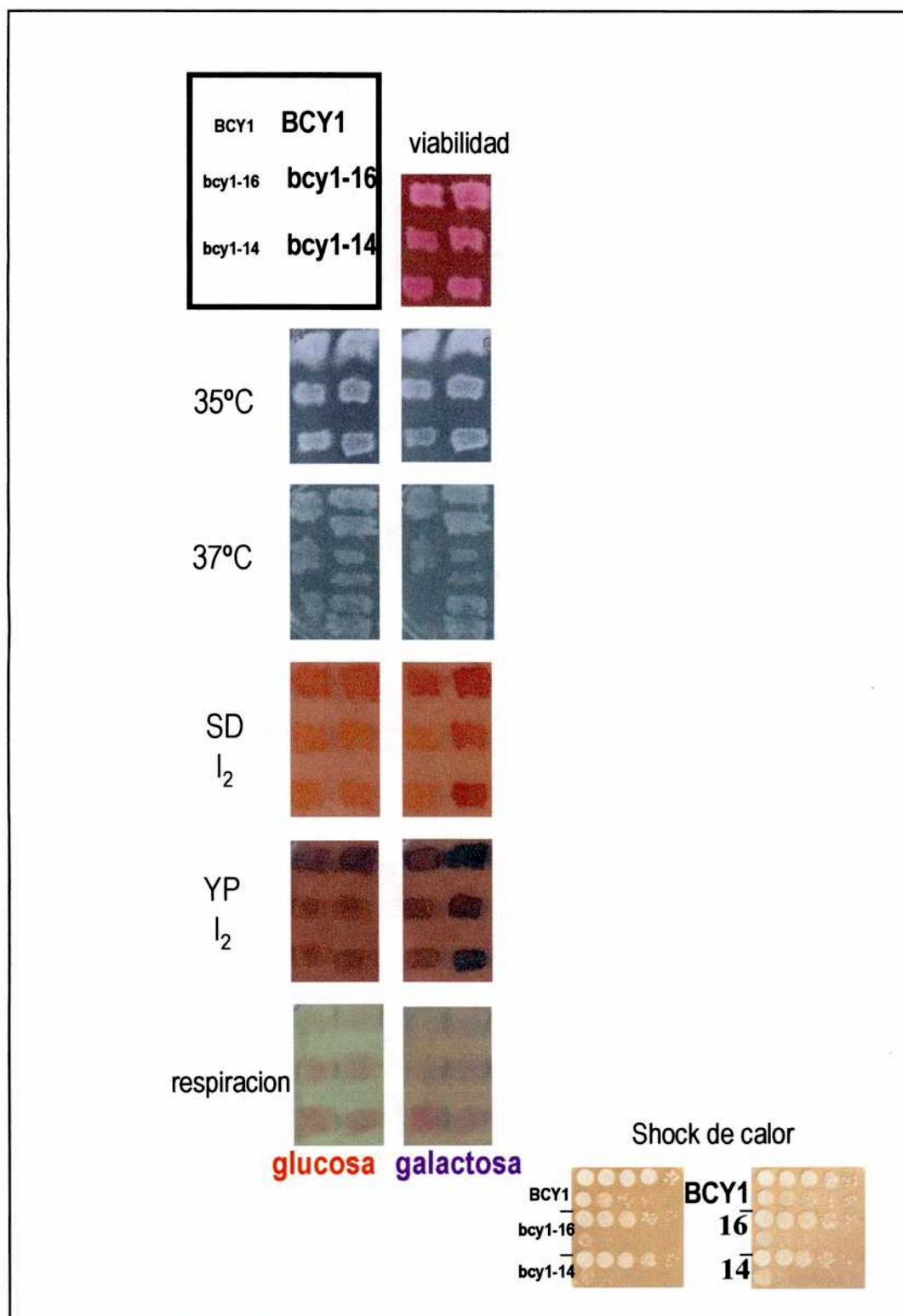
Análisis fenotípico

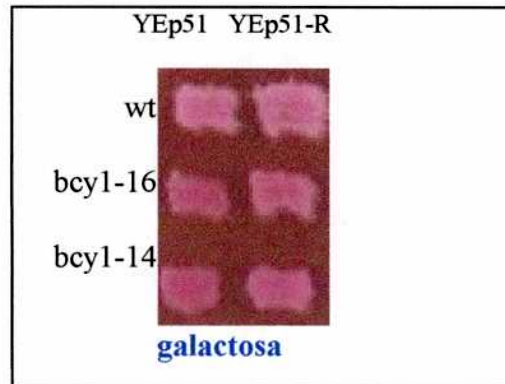
Se analizaron los siguientes fenotipos asociados a la vía del cAMP-PK A en cada una de las transformantes que sobreexpresaban las distintas subunidades R:

- acumulación de glucógeno
- resistencia al shock de calor
- termo-sensibilidad (crecimiento a 30°C y 37°C)
- capacidad de respiración
- viabilidad

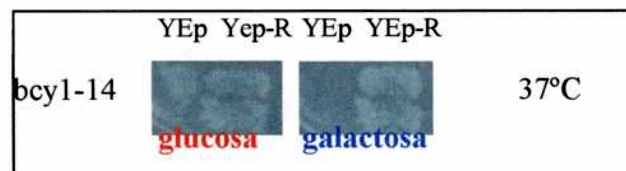
En la Figura 30 se muestra una visión en conjunto de todos los fenotipos, que luego pasan a ser analizados individualmente.

Figura 30.-Fenotipos cepas *salvaje* y *bcy1* que sobreexpresan la correspondiente subunidad R- Las cepas *salvaje* y *bcy1* transformadas con el vector vacío YEp51 (letra pequeña) o la correspondiente construcción YEp51-R (letra grande) fueron sembradas en una placa madre seguida de réplica en placas que fueron tratadas como se detalla a continuación. Se crecieron las placas en medio con glucosa o galactosa (medio inductor) según se indica. En todos los casos la placa crecida en medio inductor con galactosa fue precedida por su par en medio con glucosa durante la réplica. Tratamientos: **viabilidad**, crecimiento en medio YPD + phloxina B, **35°C**, crecimiento en el medio indicado a 35 °C, **37°C**, crecimiento en el medio indicado a 37 °C, **SD I₂**, crecimiento en medio mínimo a 30°C seguido de tinción con vapor de yodo para visualizar los niveles de glucógeno, **YP I₂**, crecimiento en medio rico seguido de tinción con vapor de yodo, **respiración**, crecimiento en medio rico + trifeniltetrazolio, **Shock de calor**, incubación 16 min a 57 °C seguido de crecimiento en medio rico. Las placas fueron incubadas por dos días antes de ser fotografiadas.

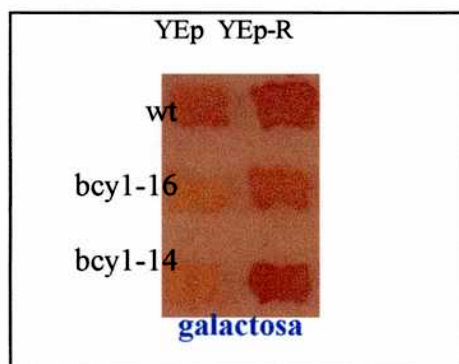


Análisis fenotípico:**Viabilidad**

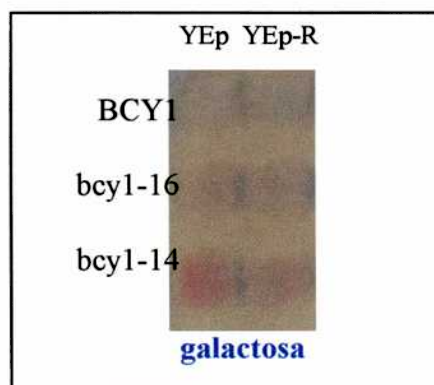
Se observa un incremento de la viabilidad en las condiciones en que se sobreexpresan las subunidades R correspondientes a cada cepa (galactosa vs glucosa; YE51 vs YE51-BCY1 ó bcy1). Es notorio que se mantiene en estas condiciones el gradiente fenotípico, siendo la más severa la cepa *bcy1-14*.

Termosensibilidad:

Esta es una característica notoria en el caso de la cepa *bcy1-14*. Esta cepa no es capaz de crecer en un medio con galactosa como fuente de carbono a 37°C y lo hace pobremente a 35°C. Se puede observar que al sobreexpresar la subunidad R correspondiente este fenotipo es revertido. Esta observación es compatible con un aumento en la viabilidad descrito anteriormente.

Niveles de glucógeno:

En las cepas que sobreexpresan la correspondiente subunidad R los niveles de glucógeno son mayores (galactosa vs glucosa; YE51 vs YE51-BCY1 ó *bcy1*). Este cambio fenotípico se correlaciona en la bibliografía, con una actividad de PK A disminuida, como se ha descrito por ejemplo para el caso de las mutantes *ras2* (ver Antecedentes).

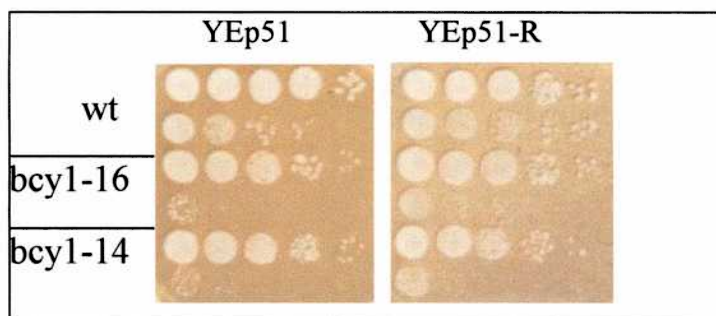
Respiración:

Los colorantes de tetrazolio son reducidos por los microorganismos que respiran, a compuestos coloreados e insolubles. La levadura salvaje creciendo en un medio con fuente de carbono no fermentable (por ejemplo acetato, etanol o glicerol) reduce el trifeniltetrazolio para producir colonias de un tono rojizo a rosado (Cannon et al, 1986).

Fue descrito previamente que todas las mutantes *bcy-1 ras2* creciendo en glucosa, permanecen blancas en presencia de este colorante (Cannon et al, 1986). Como se puede apreciar en la figura de fenotipos las cepas *bcy1-16* y *bcy1-14* en un fondo genético normal *RAS2* presentan una tonalidad rosada al crecer en un medio con glucosa. Este tono se hace más intenso en el caso de la cepa *bcy1-14*

creciendo en un medio con galactosa (bcy1-14 glucosa vs galactosa) y disminuye al sobreexpresar la correspondiente subunidad R mutada (YE_p vs YE_p-R en galactosa).

Shock de calor



Se puede observar que la sobreexpresión de R confiere en cada caso una mayor resistencia al shock de calor (YE_p vs YE_p-R). Se puede observar que se mantiene aún en condiciones de sobreexpresión el gradiente fenotípico siendo la cepa bcy1-14 la más sensible.

En todos los casos los fenotipos se hacen menos severos, asemejándose a la situación que presentan cada una de las cepas con fondos *ras2*, como si se apagara parte de la actividad quinasa, siendo ésta una evidencia más de que hay interacción entre las subunidades R mutadas y la subunidad C *in vivo*. Es notorio que a pesar del corrimiento en el grado de severidad se sigue manteniendo el gradiente fenotípico entre las distintas cepas siendo la más severa la cepa bcy1-14. Una posible explicación sería el desplazamiento hacia la formación de holoenzima provocado por un aumento en la relación R/C.

Para tratar de entender como es que se mantiene el gradiente fenotípico en presencia de un exceso de R tan grande se analizó la dependencia con el cAMP que presentan las distintas muestras en preparaciones semipurificadas y en células permeadas.

Actividad de PK A en preparaciones semipurificadas

En la Tabla 11 se muestran los valores de actividad PK A para preparaciones semipurificadas de cada una de las transformantes según se indica en M&M.

Tabla 11. Niveles de subunidad C de la PK A y dependencia con el cAMP, en extractos de cepas que sobreexpresan la subunidad R. Los niveles de C fueron medidos en alícuotas de muestras semipurificadas (ver M&M) de células en crecimiento exponencial (17 horas) en medio inductor con galactosa. Los valores representan las medias $\pm$ SD de muestras independientes.

cepa	Actividad de PK A (U/mg proteína)	
	-cAMP	+cAMP
wt(YEp51)	56.7 $\pm$ 19.2	72.8 $\pm$ 19.2
wt(YEp51-BCY1)	5.8 $\pm$ 1.5	51.5 $\pm$ 9.6
16(YEp51)	40.7 $\pm$ 12.7	50
16(YEp51-bcy1-16)	11.6 $\pm$ 1.6	17.4 $\pm$ 1.9
14(YEp51)	39.1 $\pm$ 9.4	38.1 $\pm$ 1.2
14(YEp51-bcy1-14)	18.7 $\pm$ 1.6	17.9 $\pm$ 4.2

En el caso de la sobreexpresión de R salvaje la preparación enzimática se hace dependiente de cAMP (10 μ M). Esto concuerda con la hipótesis de que un exceso de R desplaza el equilibrio hacia la formación de holoenzima, preservándola aún a la concentración diluyente del extracto. Sin embargo no se observa dependencia con cAMP en el caso de la sobreexpresión de las variantes mutadas. Lo que ocurre en estos casos es que la actividad total alcanzada es menor a la que presentan sus respectivos controles. Esto podría deberse a que la concentración de cAMP ensayada (10 μ M) no fuese suficiente para activar toda la quinasa presente en estas condiciones de altísima relación R/C. Cabe preguntarse en este punto qué refleja la actividad independiente de cAMP detectable a pesar del gran exceso de R presente.

Dependencia de la actividad de PK A con cAMP en células permeadas

Como se ha mencionado anteriormente el sistema de células permeadas preserva las condiciones intracelulares reflejando más fielmente lo que ocurre *in vivo*. Se

midio actividad quinasa en presencia o ausencia de 10 μ M cAMP para las cepas wt, 16 y 14 transformadas con el vector vacío o sobreexpresando la correspondiente variante *bcy1*. Los resultados se muestran en la figura 31.

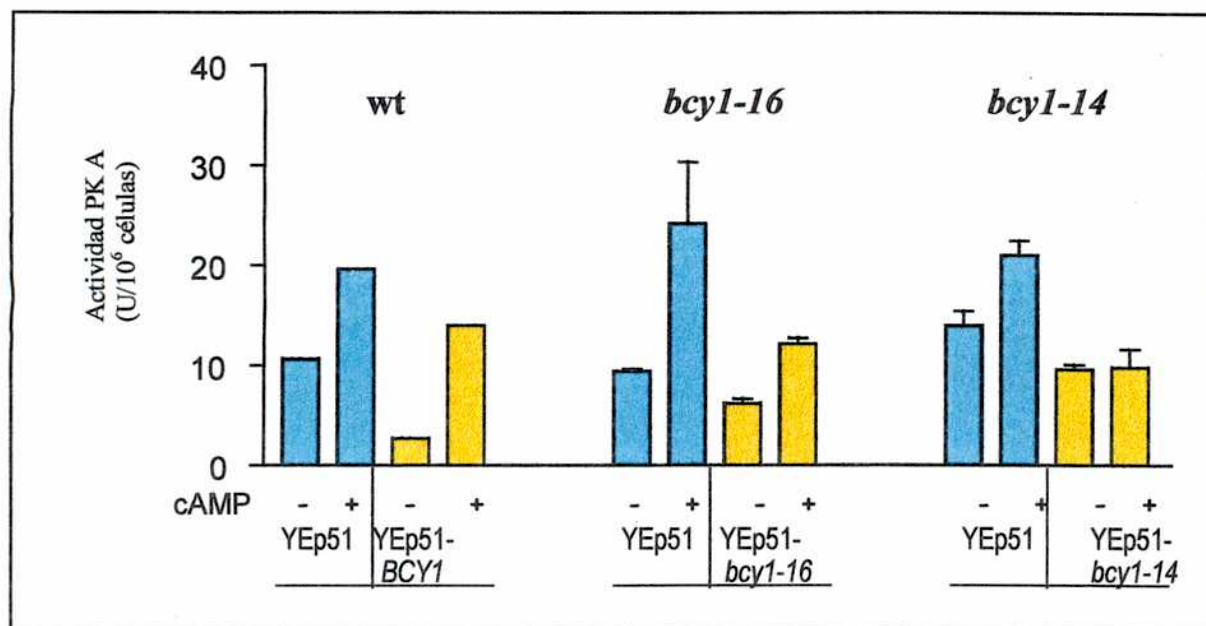


Figura 31- Actividad de PK A en células permeadas de cepas que sobreexpresan R. Cepas wt, *bcy1-16* y *bcy1-14* transformadas con el vector vacío (YE51, turquesa) o la construcción correspondiente, según se indica (YE51-R, amarillo). Las células fueron permeabilizadas y luego se midió actividad de PK A según se indica en M&M.

Teniendo en cuenta el volumen celular de una levadura y los factores de dilución aplicados hasta llegar al volumen final de ensayo, se estima una diferencia de dos órdenes de magnitud en la concentración de la PK A. Por lo tanto esta diferencia es la esperada entre células permeadas y muestras procesadas.

A diferencia del ensayo con muestras semipurificadas, se observa que la actividad quinasa es dependiente del agregado de cAMP en todas las cepas control, como ya fue mostrado para estas mismas cepas en un fondo genético *ras2* (Figura 27).

La cepa salvaje que sobreexpresa la subunidad R muestra una mayor dependencia que su control (cepa wt vs. wtBCY1), pero es de notar que alcanza el 70% del valor de máxima actividad en presencia de cAMP de la cepa control. A diferencia del ensayo con muestras semipurificadas, en el caso de la cepa 16 que sobreexpresa la correspondiente R mutada (16*bcy1*) se observa dependencia con

A diferencia del ensayo con muestras semipurificadas, en el caso de la cepa 16 que sobreexpresa la correspondiente R mutada (16bcy1) se observa dependencia con cAMP, pero la actividad máxima desarrollada en presencia de cAMP sigue siendo significativamente menor que en el caso de la cepa control (16bcy1 vs 16).

En el caso de la cepa 14 que sobreexpresa la correspondiente R mutada (14bcy1) no se logra observar dependencia con cAMP y al igual que en el ensayo con muestras semipurificadas la actividad total alcanzada es significativamente menor a la observada en el caso de su cepa control (14bcy1 vs 14).

Es de notar que existe una correlación entre las actividades registradas en ausencia de cAMP en las cepas que sobreexpresan R y el grado de severidad de los fenotipos asociados a PK A, siendo la cepa 14bcy la más severa y la que presenta mayor actividad independiente de cAMP. Cabe volver a preguntarse qué está reflejando esta actividad independiente de cAMP, siendo que está altamente favorecida la formación de holoenzima ya que existe un gran exceso de R y en todos los casos el cAMP parece estar en un nivel subsaturante dada la alta concentración de enzima que se estima presente en este sistema. Como ya ha sido mencionado anteriormente la constante de activación (K_a) para el cAMP aumenta cuanto mayor es la concentración de holoenzima presente (ver Resultados Línea 1/Antecedentes).

Por todo esto postulamos que probablemente esta actividad independiente de cAMP pueda deberse a la desarrollada por la holoenzima parcialmente activada.

Caracterización bioquímica preliminar de las subunidades R mutadas.

Curvas de saturación y análisis de Scatchard

Aplicando el protocolo de semipurificación antes descrito se obtuvieron preparaciones enriquecidas en subunidad R salvaje, *bcy1-16* o *bcy1-14*. Estas fueron usadas para ensayos de Scatchard con el fin de analizar la afinidad de las distintas subunidades por el cAMP.

Los ensayos de unión de [3 H]cAMP se llevaron a cabo a 4°C durante 16 hs (ON) como se indica en M&M, dado que en estas condiciones todas las proteínas utilizadas alcanzan el equilibrio. Se realizaron curvas de saturación de [3 H]cAMP para las preparaciones wt, *bcy1-16* y *bcy1-14* (Figura 32).

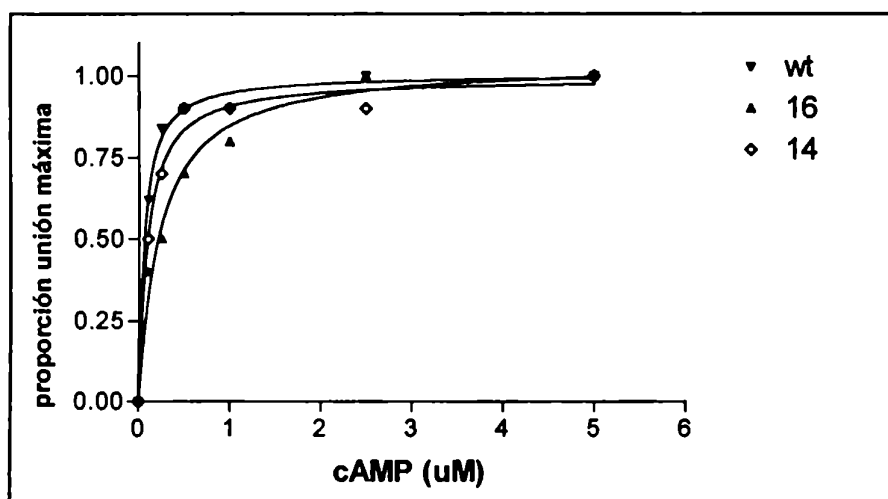


Figura 32- Curvas de saturación. Las muestras Rwt, R16 y R14 fueron semipurificadas como se indica en M & M. El valor de unión máxima se tomó como 1 (uno) y fue de 14.5, 49.5 y 66 fmoles de [3 H]cAMP / μ g proteína para Rwt, R16 y R14 respectivamente.

La afinidad (K_d) se calculó empleando el método de Scatchard (Figura 33)

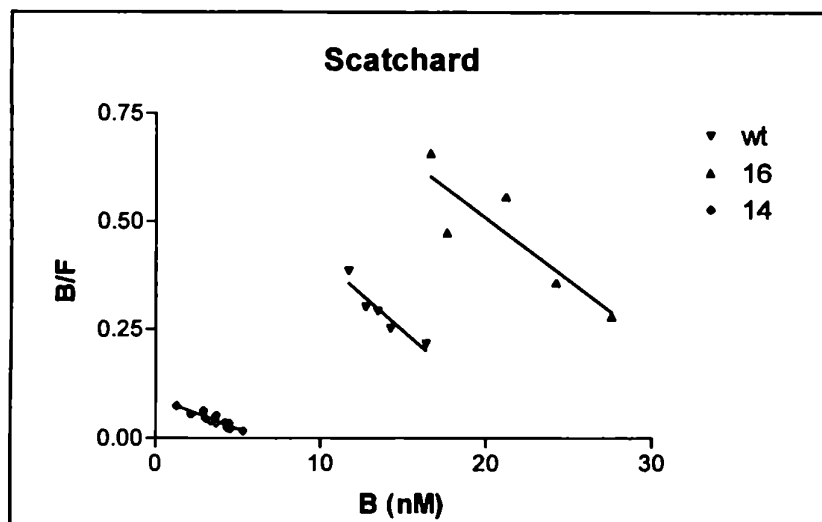


Figura 33- Análisis de Scatchard. Las diferencias en los números de sitios (valor de la intercepción con X) se debe a diferencias en el rendimiento de la sobreexpresión en cada caso particular, reflejando que se usaron concentraciones de R distintas a igual masa de proteínas.

De este análisis surge que los valores de K_d son de 30 nM, 34 nM y 71 nM para Rwt, R16 y R14 respectivamente. Los ensayos de unión a cAMP en extractos crudos indicaban que las cepas *bcy1* poseían una afinidad por el nucleótido cíclico muy disminuida respecto de la Rwt lo que no se refleja del análisis de Scatchard. Las diferencias pueden deberse a que las condiciones de ensayo son distintas (30°C 20 min vs 4°C ON) así como la fuente de enzima (R endógena posiblemente asociada a C vs R sobreexpresada no asociada a C). Los datos bibliográficos indican que la subunidad R salvaje posee un K_d que oscila entre 60 y 150 nM (Johnson et al, 1987).

Competencia de la unión del [3 H]cAMP con análogos selectivos de sitio

Para avanzar en la caracterización bioquímica de las R mutantes se realizaron ensayos de competencia con análogos selectivos de sitio. Se eligieron dos análogos, el N⁶-benzoil-cAMP (clásicamente de sitio A) y el 8-bencilamino- cAMP (clásicamente de sitio B). No podíamos decir *a priori* si la selectividad de sitio sería la clásica para estos análogos ya que no existen antecedentes previos al respecto para la subunidad R de *S.cerevisiae*. Las curvas de competencia se muestran en la figura 34.

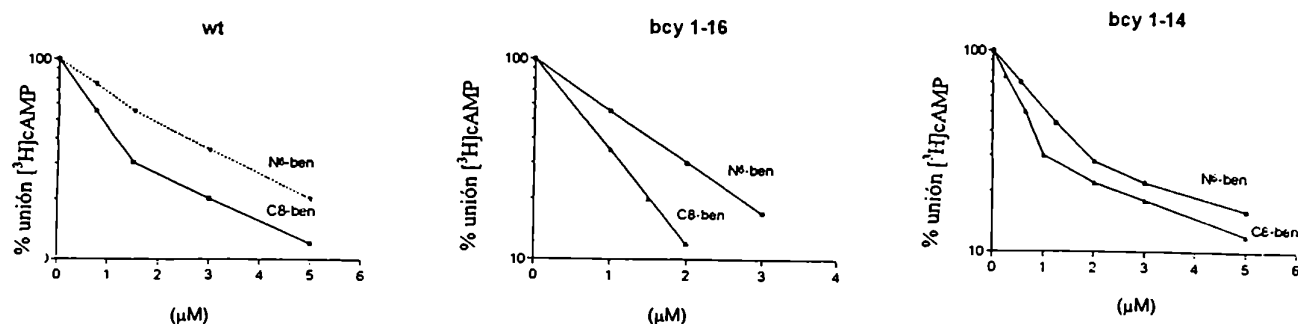


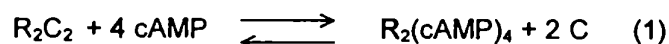
Figura 34: Curva de competencia con análogos. Las muestras Rwt, R16 y R14 fueron semipurificadas como se indica en M & M. El valor de unión en ausencia de competidor (100%) fue de 1,5 , 2 , y 1,8 pmoles de cAMP unido para Rwt, R16 y R14 respectivamente. Las condiciones de ensayo fueron 16h a 4°C en presencia de [³H]cAMP 1 μM.

El análogo de cAMP sustituido en N⁶ no distingue entre los dos sitios en la subunidad R salvaje. Sin embargo sí lo hace en el caso de bcy1-14, sugiriendo que alguno de esos sitios tiene alterada su interacción con éste. Por otra parte el análogo sustituido en C8 distingue dos sitios tanto en la R salvaje como en bcy1-14. En el caso de la variante mutada bcy1-16, ambos análogos dan una curva de competencia por la unión del [³H]cAMP monofásica, como era de esperar por no existir físicamente el sitio B. En todos los casos el análogo sustituido en C8 fue mejor competidor que el N⁶, esto podría interpretarse como que fuese selectivo por el sitio A.

Velocidad de disociación

Se realizaron ensayos de desplazamiento de [³H]cAMP unido para medir la velocidad de disociación del nucleótido cíclico.

La activación de la holoenzima por cAMP se rige por la siguiente ecuación general:



Analizando la reacción reversa de la ecuación 1 se determinó que la presencia de la subunidad C induce un aumento en la velocidad de disociación del cAMP unido a la

subunidad R libre, afectando principalmente la velocidad de disociación del sitio A, en presencia de altas concentraciones de cAMP frío (Øgreid and Døskeland, 1983). Con el objetivo de analizar no solo las velocidades de disociación de cada R sino también la capacidad de cada una de interaccionar con C, se realizaron los ensayos de desplazamiento en ausencia o presencia de subunidad catalítica de origen bovino, gentilmente provista por el laboratorio del Dr. Døskeland. Se reprodujeron, como punto de partida, las mismas condiciones experimentales que las utilizadas por el mencionado grupo. Los cambios metodológicos introducidos para medir unión de [^3H]cAMP a R se indican en M & M. El ensayo de unión de [^3H]cAMP a R se realizó a 25 °C durante 30 min en presencia de una concentración de 40 nM de sitios de unión. Esta concentración fue estimada a partir del valor de unión de [^3H]cAMP observado en un ensayo previo. Los ensayos de desplazamiento se realizaron en el rango de tiempos indicados a 25°C, NaCl 0.15 M (baja sal) y 100 μM cAMP frío. La presencia de una alta concentración de cAMP frío disminuye la posibilidad de que el nucleótido marcado se vuelva a unir a R, por dilución isotópica. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 35.

Las velocidades de disociación de [^3H]cAMP unido indican que la R salvaje y la bcy1-14 presentan dos sitios, mientras que la bcy1-16 posee solo uno. Los parámetros cinéticos del único sitio de bcy1-16 no parecen estar muy alterados, al igual que la velocidad de disociación de los sitios A y B de la mutante bcy1-14.

La subunidad C de la PK A de origen bovino, es capaz de producir un aumento en la velocidad de disociación del [^3H]cAMP de la subunidad R de *S. cerevisiae*, en presencia de una alta concentración de cAMP frío reflejando la interacción entre R y C en presencia de cAMP. Es de notar que en el caso de R16, la presencia de C estimula la velocidad de disociación del cAMP unido de manera más efectiva que en el caso de Rwt, mientras que R14 es casi insensible.

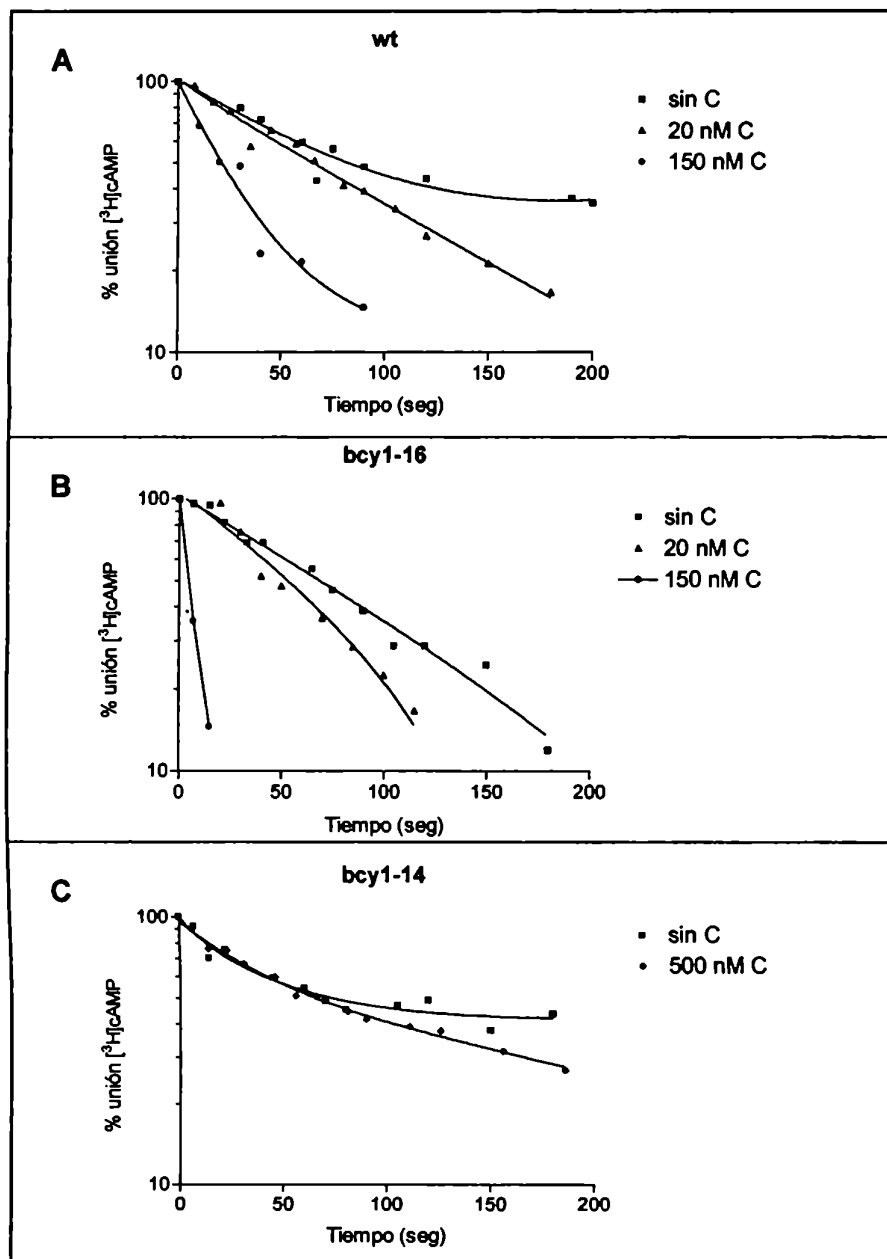


Figura 35- Velocidad de disociación del cAMP en presencia de subunidad catalítica. Una concentración fija de sitios (40 nM) de las muestra Rwt (A), R16 (B) y R14 (C) fue incubada con $[^3\text{H}]\text{cAMP}$ 0.2 μM 30 min a 25°C, en un volumen final de 50 μl . Una alícuota de esta reacción fue diluida en presencia de cAMP frío 100 μM en ausencia ($\blacksquare$) o presencia de subunidad C, 20 nM ($\blacktriangle$), 150 nM ($\bullet$) ó 500 nM ($\blacklozenge$). Se incubó a 25°C y se retiraron alícuotas de estas reacciones a los tiempos indicados frenando la reacción de desplazamiento por dilución de la muestra en sulfato de amonio 80%.

Posteriormente se analizó más en detalle el efecto de C sobre las distintas Rs a un tiempo fijo, en el cual el desplazamiento en ausencia de C, observado en la Figura

36, supere el 50%.; se fijó en 1min para R16 y en 2 min para Rwt y R14. Los resultados se observan en la figura 37.

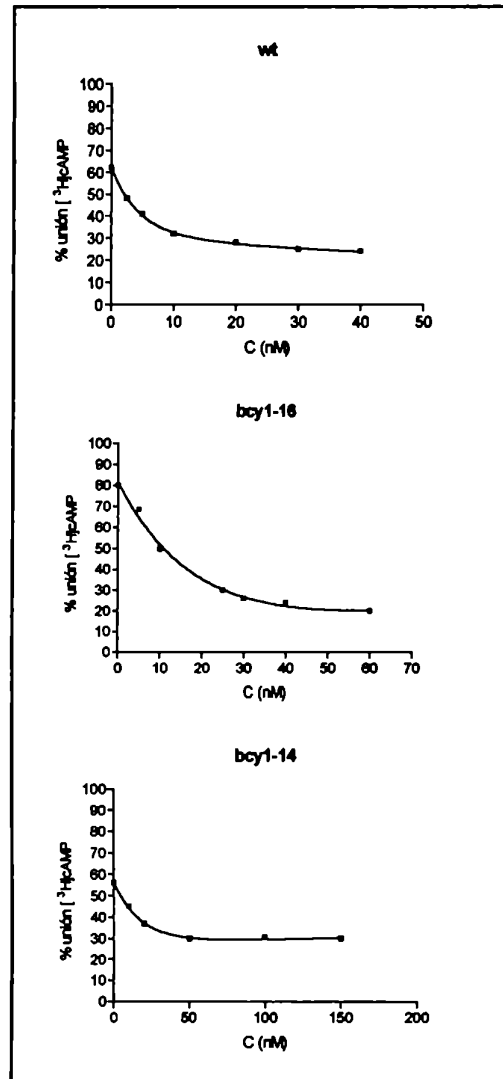


Figura36- Velocidad de disociación del cAMP en presencia de concentraciones variables de C. Las condiciones de ensayo son iguales a las de la Figura 35, con la diferencia que se fijó el tiempo de la reacción de desplazamiento en 1 min para R16 y 2 min para Rwt y R14.

En todos los casos existe una interacción entre R y C. La mutante *bcy1-16*, interactúa con una afinidad ligeramente menor que la subunidad salvaje, produciendo una variación mayor en la velocidad de disociación que la cepa salvaje. En cambio la subunidad R14 interactúa con C con una afinidad ligeramente menor que R16 pero esta interacción produce un cambio mucho menor en la velocidad de disociación del [^3H]cAMP

afectando, al parecer, solo uno de los sitios de unión de cAMP. Podría ser que en estas condiciones de ensayo R14 no esté totalmente ocupada y que por lo tanto el 100% esté sobreestimado. Otras posibilidades se discuten en "Discusión- línea 2".

Se han postulado varias hipótesis para explicar la reversión diferencial de los fenotipos *ras2::LEU2* por las cepas *bcy1* mutantes.

La primer hipótesis propone que podría deberse a un cambio en la relación R/C de manera tal que aumente la C libre ya sea por aumento de la expresión de C o por disminución de la vida media de R. Los resultados presentados en esta Tesis no apoyan esta explicación. Los niveles totales de C encontrados en las cepas *bcy1* no difieren significativamente de los que presenta la cepa salvaje. Podría ser que los niveles de C fuesen similares y que hubiesen disminuido los niveles de R de manera tal que la relación R/C en las mutantes fuese disminuyendo de acuerdo a la severidad de sus fenotipos. Por el contrario, las relaciones R/C en las mutantes *bcy1* relativas a la que presenta la cepa salvaje son mayores, indicando que la creciente actividad PK A asociada a los alelos *bcy1* mutados no se debería a un aumento en los niveles de C. Esta hipótesis no puede ser descartada en el caso particular de la cepa *bcy1-6*.

La segunda hipótesis se refiere a la posibilidad de que las variantes mutadas *bcy1* tuviesen una afinidad mayor por el cAMP respecto de la proteína salvaje y se activaran en presencia de concentraciones cada vez menores de cAMP. La evidencia presentada, utilizando extractos crudos, indicaría exactamente lo opuesto, esto es que las variantes *bcy1* parecen presentar una disminución en la afinidad por el cAMP. Primeramente la unión de cAMP no llega a saturación aún a 3 μ M, una concentración 10 veces mayor que la requerida para saturar la proteína salvaje (salvo en el caso de *bcy1-15*, en que los sitios de unión a cAMP permanecen intactos). En segundo lugar, la sobreexpresión del gen *PDE2* no afectó los fenotipos desarrollados por las cepas mutantes *bcy1 ras2::LEU2*. Si las distintas mutaciones aumentasen la afinidad de R por cAMP, se esperaría que una disminución de los niveles de cAMP afectase la reversión de los fenotipos dependientes de PK A.

La tercer hipótesis predice que las mutaciones en R podrían afectar su estructura terciaria de manera tal que ésta adopte parcialmente los cambios conformacionales que resultan de la unión del cAMP en la R salvaje pudiendo disminuir diferencialmente la afinidad de R por C. Los resultados presentados indican que todas las variantes mutadas de R son capaces de interaccionar con C:

- se observa un aumento en la severidad de los fenotipos cuando se hace normal el camino del cAMP (cepas *ras2::LEU2* vs *RAS2*),
- relaciones -cAMP/+cAMP menores a uno en ensayos de células permeadas,
- cambios fenotípicos en el caso de las mutantes en que se sobreexpresaron las correspondientes variantes *bcy1* (*bcy1-16* y *bcy1-14*),

- en el caso de las proteínas *bcy1-16* y *bcy1-14* semipurificadas, se vio que son capaces de interactuar con una subunidad C de mamíferos, aún en presencia de altas concentraciones de cAMP

Cabe la posibilidad de que la actividad quinasa sobre kemptido en células permeadas en ausencia de cAMP se deba, en parte, a la desarrollada por holoenzimas mutadas parcialmente activadas, que son capaces de tener actividad permaneciendo unidas a R. Esta situación se ve altamente favorecida en el caso en que se sobreexpresan las variantes *bcy1-16*, *14* y salvaje. Frente a un exceso de R tan grande es de esperar que en ausencia de cAMP toda la C se encuentre formando parte de la holoenzima y cabe notar que en esta condición se observa actividad en ausencia de cAMP en el caso de la R salvaje (Figura 31), indicando la posibilidad de que esto ocurra *in vivo* en condiciones naturales. Por otro lado existe una correlación entre los niveles de actividad en ausencia de cAMP en células permeadas desarrollado por las cepas que sobreexpresan R y el grado de severidad fenotípica que éstas presentan (Figuras 30 y 31).

De los estudios bioquímicos preliminares utilizando las proteínas R salvaje, *bcy1-16* y *bcy1-14* surge que la afinidad por el cAMP es similar para las tres, en las condiciones en que se realizó el ensayo. El análisis de Scatchard indica sitios con una única afinidad para todos los casos. Se sabe que la R salvaje libre posee dos sitios con igual afinidad y es de esperar que la proteína *bcy1-16* tenga solo uno, debido a la falta total del sitio B. No es clara la situación de la R *bcy1-14*. Podría ser que en las condiciones ensayadas solo se esté detectando uno solo de los sitios. Sin embargo, tanto las velocidades de disociación de [³H]cAMP (Figura 35) como la curva de competencia con análogos específicos de sitio (Figura 34), indican que esta proteína posee dos sitios capaces de unir cAMP. Lo que parece estar significativamente afectada en el caso de *bcy1-14* es su interacción con C (Figura 35). Otra posibilidad es que esté seriamente afectada tanto su interacción con C como la capacidad de la holoenzima mutada de responder al cAMP, sin que se encuentre muy alterado el comportamiento de la subunidad R mutada libre frente al cAMP. En estudios recientes se han podido establecer subdominios para reconocimiento de cAMP y para C en el dominio A de R_k, mediante el uso del sistema de doble híbrido en levaduras, que permite analizar interacciones proteína-proteína (Huang & Taylor, 1998). Fueron identificados dos grupos de aminoácidos que contribuyen a la alta afinidad de R por C: residuos 94-169, que contienen la

secuencia consenso y la región que va desde Ser236 a Tyr244 en la hélice α C (esta misma porción es la que está ausente en *bcy1-14*). Esta porción de hélice (Figuras 37 y 38) tiene especial importancia ya que sería capaz de coordinar varias funciones como ser:

1. Posicionar y estabilizar, junto con las hélices A y B, las hojas plegadas β , responsables de la unión de cAMP
2. Unir C con alta afinidad, en ausencia de cAMP
3. Regular el acceso al sitio A de unión de cAMP, modulando las interacciones con cAMP, con la subunidad C y con el sitio B de unión de cAMP.

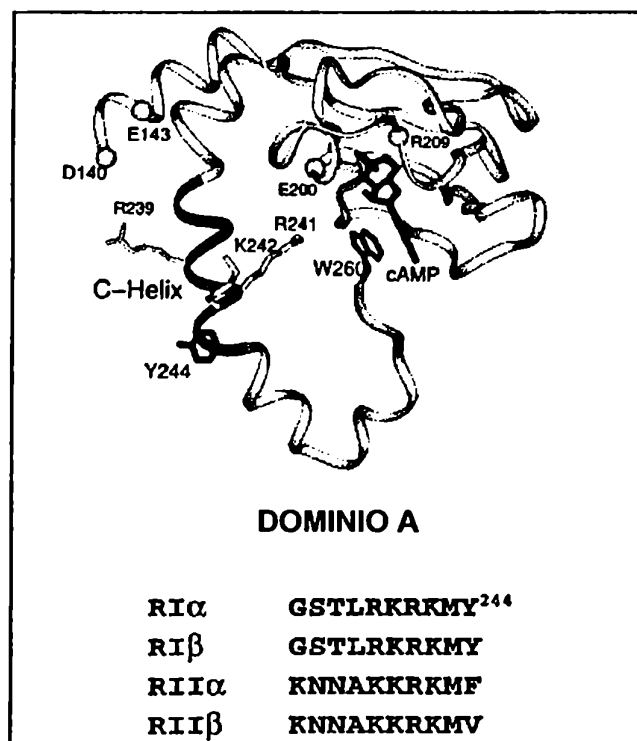


Figura 37-Dominio A de unión al cAMP. La hélice C que se extiende desde Ser206 hasta Tyr244 se presenta oscurecida dentro de la estructura general del dominio A. Debajo se encuentra el alineamiento en las secuencias de aminoácidos dentro de esta región, de RI y RII. R241 se encuentra altamente conservada también en eucariontes inferiores. También están indicados D140 y E143, importantes para la interacción R-C y E200 y R209, necesarios para la unión del cAMP.

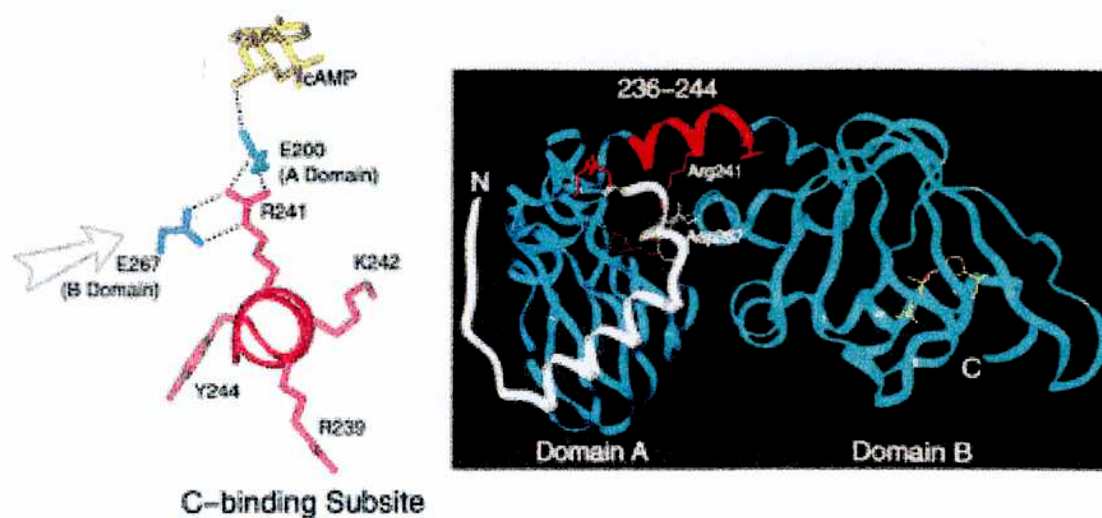


Figura 38-Subdominios del sitio A de unión al cAMP. Derecha: los residuos 236-244 de la hélice C del sitio A de unión al cAMP están resaltados en color rojo. dentro de el modelo de estructura cristalina de RIΔ1-91. Las dos moléculas de cAMP se muestran en amarillo, el dominio A está mostrado de color azul oscuro y el dominio B en celeste. Los residuos 113-140 que preceden al sitio A se presentan en blanco. Derecha: se muestra en detalle las interacciones de la porción 236-244 de la hélice α C del dominio A de unión al cAMP. Las líneas punteadas verdes entre cAMP, E200, R241 y D267 representan puentes de H.

Conclusiones genera

CONCLUSIONES GENERALES

La concentración intracelular de la PK A es del orden de μM , cercana a la del cAMP (Beavo *et al*, 1974). Es de notar que casi no se puede detectar actividad quinasa si se intenta trabajar a esta concentración de holoenzima *in vitro*. De acuerdo a los resultados obtenidos en la línea 1, con concentraciones de enzima no lineales en el orden de nM, es de esperar que *in vivo*, el efecto de la modulación de su actividad por el sustrato y los policationes sea aún más significativo. De hecho, las mutantes *bcy1* de *S.cerevisiae* así lo reflejan, a través del ranking de fenotipos *in vivo* sumado a las mediciones de actividad en extractos crudos versus células permeadas.

De los experimentos realizados en la línea 2 se desprende que en las holoenzimas mutadas la interacción R-C está disminuida, no a través de la unión de cAMP sino debido a la mutación que imitaría su efecto. En otras palabras, cada variante mutada podría representar una posible conformación por la que puede pasar la holoenzima salvaje, dependiendo de la concentración de cAMP.

Basándonos en los resultados de ambas líneas presentados en esta Tesis, postulamos a modo de **hipótesis** el siguiente modelo (Figura 39)

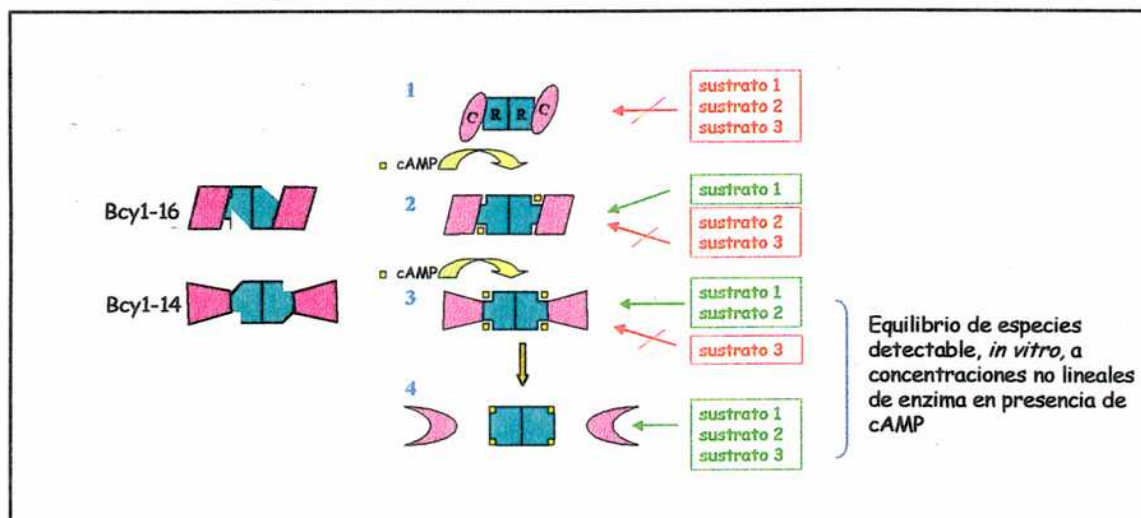


Figura 39- Modelo de activación de PK A. Posible modelo contemplando variantes conformacionales que podrían generarse dependiendo de la concentración de cAMP y del entorno iónico, que oscilan entre 1) holoenzima inactiva 2 y 3) holoenzima parcialmente activada, no disociada y 4) holoenzima totalmente activada, disociada.

Materiales y métodos

Sección 1

Sección I

Línea 1

ORGANISMO UTILIZADO

La cepa de *Mucor rouxii* utilizada, es la NRRL 1894, obtenida originalmente por el Dr W. C. Hesseltine y cedida a la Dra Passeron por el Dr Roger Storck.

OBTENCIÓN DE ESPORAS Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA

El mantenimiento de la cepa y la obtención de las esporas utilizadas para el cultivo del hongo, fueron hechos de acuerdo a lo descrito por Haidle y Storck (Haidle et al, 1966), en agar-jugo de tomate.

PREPARACION DE HOLOENZIMA (PK A) PARCIALMENTE PURIFICADA

Se incubaron inóculos de 5×10^5 esp/ml en medio YPG. Una preparación típica comprende 500 ml de medio de cultivo en Erlenmeyers de 2 l. Luego de 14-16 hs de crecimiento (fase logarítmica), los cultivos fueron cosechados por filtración a través de papel Whatman N 1, lavados exhaustivamente con agua destilada fría y molidos con N_2 líquido, hasta obtener un polvo fino que fue procesado inmediatamente. Se obtuvieron en general 5 gr de micelio a partir de 500 ml de medio. Todos los pasos que se detallan se realizaron a 4° C.

El polvo de micelio se extrajo con dos volúmenes de buffer GB, con agitación suave durante 20 min. Se centrifugó a 10.000 rpm (15.000xg) durante 30 min. El sobrenadante (S10) fue cromatografiado en una columna de DEAE-Sepharosa en una relación de 20 mg de proteína por ml de resina.

La columna fue lavada con dos volúmenes de buffer GB y eluida con dos concentraciones de NaCl en GB, 0,12 y 0,35 M, dos volúmenes en cada caso; se tomó la fracción correspondiente a 0,35 M de NaCl, la cual fue precipitada con sulfato de amonio 80% de saturación. En este paso la preparación enzimática fue guardada en alícuotas a -20 °C. Posteriormente se sometieron estas muestras a una centrifugación en gradientes de sacarosa siendo previamente desaladas mediante pasaje por una columna de Sephadex G-25.

PREPARACION DE SUBUNIDAD CATALITICA PARCIALMENTE PURIFICADA

Para aislar la subunidad catalítica se incubó la preparación de holoenzima obtenida después del pasaje por DEAE con cAMP 10 μ M y NaCl 0.5 M. Luego se separaron las subunidades catalíticas de las regulatorias sometiendo la preparación a una centrifugación en gradiente de sacarosa equilibrado con cAMP 0.4 μ M y NaCl 0.5 M como fue previamente descripto (Moreno & Passeron, 1980).

CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA

Se prepararon gradientes lineales 5-20% de sacarosa, en buffer GB, superponiendo 7 capas de 650 μ l cada una; se dejaron a temperatura ambiente durante 2 hs, se enfriaron a 4 °C. Las alícuotas guardadas a -20°C fueron desaladas mediante pasaje por una columna de Sephadex G-25 y sembradas en los gradientes. Las muestras sembradas contenían entre 300 y 600 μ g de proteína, en un volumen de 200 μ l. Se centrifugaron durante 15 hs a 4° C en un rotor SW 55 Ti Beckman, a 35000 rpm.

Los gradientes se fraccionaron desde el fondo hasta la superficie haciendo sifón en 22- 25 fracciones de aproximadamente 200 μ l; alícuotas de estas fracciones fueron utilizadas para medir actividad de PKA y para actividad ligante de cAMP.

Se usaron como marcadores catalasa (11,3 S), peroxidasa (3,5 S) y citocromo c (1,7 S).

ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE PKA

Medición de actividad quinasa

La actividad quinasa se determinó ensayando su capacidad de transferir un grupo fosfato a los péptidos o proteínas indicados como sustratos. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 70 μ l conteniendo buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 , 2-mercaptoetanol 2 mM, EGTA 0,5 mM, EDTA 0,1 mM, MgCl₂ 10 mM, [γ ³²P] ATP 50 μ M (300-1000 cpm/pmol), el sustrato indicado en cada caso y la concentración de cAMP que corresponda según se detalla en cada ensayo. La reacción se inició con el agregado final de la preparación enzimática. Luego de incubar 10 min a 30° C las reacciones se detuvieron sembrando 50 μ l en papeles de fosfocelulosa (Whatman P-81) de 2x2 cm, que fueron sumergidos en ácido fosfórico 75 mM, y lavados 3 veces, 5 min cada vez, con el mismo ácido y una última vez con etanol (Roskoski, 1983). Los papeles fueron secados y

se determinó la radiactividad en solución centelleadora de tolueno. Esta metodología fue utilizada para aquellos sustratos que contenían dos o más residuos básicos. En los experimentos en que se utilizaron los péptidos ARAASVA y AARASVA los ensayos se realizaron según Donella-Deana et al, 1993. Básicamente esta técnica involucra la finalización de las incubaciones por la adición de ácido acético glacial hasta una concentración de 30% y la incorporación de P^{32} se mide usando una combinación de cromatografía de intercambio iónico y extracción con isobutanol/ benceno.

Se definió unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 μ mol de fosfato a sustrato en 1 min bajo las condiciones standard de ensayo.

Los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ para los distintos sustratos peptídicos y protamina fue calculado de los gráficos doble recíprocos confeccionados a partir de las mediciones de velocidades iniciales regidas por la ecuación de Michaelis-Menten. Los datos presentados reflejan los valores de tres determinaciones independientes, como mínimo. El error standard (SEM) fue de $\pm 20\%$ para todas las constantes cinéticas reportadas.

Inhibición de actividad quinasa por el inhibidor termoestable PKI

La subunidad C libre o la holoenzima parcialmente purificada fueron preincubadas con concentraciones variables (0-1000 nM) del péptido derivado del inhibidor termoestable (PKI₈₋₂₂), durante 5 min a 30°C en buffer Tris/ClH 50 mM, pH:7.4; conteniendo [γ 32 P] ATP 0.1 mM (800 cpm/pmol), EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM, MgCl₂ 10 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM. El ensayo se inició con la adición del sustrato. Los péptidos indicados y la protamina fueron usados a sus respectivas K_m (Tabla 3). Después de 5 min de incubación a 30°C, se procesaron alícuotas de cada reacción por el método del papel de fosfocelulosa como ya se indicó previamente.

El valor K_i fue calculado a partir del dato experimental, IC_{50} , de acuerdo con la siguiente ecuación para inhibidores competitivos (Glass et al, 1992):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [S] / K_m}$$

Medición de actividad ligante de cAMP

La medición se basó en la capacidad de la subunidad R de unir [3 H]cAMP.

De esta manera se estimó la concentración de holoenzima a partir del dato de cAMP unido, teniendo en cuenta que se unen cuatro moléculas de cAMP por holoenzima.

Para esto, alícuotas de preparaciones conteniendo 50-150 µg de proteína total fueron incubados con 0,3 µM [³H]cAMP (10⁴ cpm/pmol), 0,5 M NaCl en Tris-HCl 15 mM pH 7,0. Luego de 30 min de incubación a 30 °C se frenó la reacción sembrando una alícuota directamente en un filtro de nitrocelulosa (0,45 µm). Los filtros fueron lavados con grandes volúmenes de Tris-HCl 15 mM pH 7, se secaron y la radiactividad fue contada con solución centelleadora de tolueno (Moreno *et al.*, 1983).

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

OTRAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Peroxidasa

Se siguió la técnica descrita en el manual de Worthington (1972), midiendo colorimétricamente el producto de oxidación de la o-dianisidina por agua oxigenada en presencia de la enzima.

Catalasa

Se midió la actividad enzimática valorando el sustrato no consumido (agua oxigenada) con solución de KI, de acuerdo al método de Terenzi *et al.*, (1971).

Citocromo C

Se valoró por espectrofotometría en el visible, midiendo la absorbancia a 410 nm.

Materiales y métodos

Línea 2

ORGANISMOS UTILIZADOS

Cepas de *S. cerevisiae* gentilmente cedidas por el Dr. Tatchell (LSU Medical Center, USA)

<i>cepa</i>	<i>genotipo</i>
302-26b	MAT α leu2 ura3 his4 ras2-530(RAS2::LEU2)
622	MAT α leu2 ura3 his4 ras2-530(RAS2::LEU2) sra1-15
623	MAT α leu2 ura3 his4 ras2-530(RAS2::LEU2) sra1-16
562	MAT α leu2 ura3 his4 ras2-530(RAS2::LEU2) sra1-12
564	MAT α leu2 ura3 his4 ras2-530(RAS2::LEU2) sra1-14
669	MAT α leu2 ura3 his4 ras2-530(RAS2::LEU2) sra1-6
671	MAT α leu2 ura3 his4 ras2-530(RAS2::LEU2) sra1-13
1121	MAT α leu2 ura3 sra1-6
1123	MAT α leu2 ura3 sra1-15
1125	MAT α leu2 ura3 sra1-13
1127	MAT α leu2 ura3 sra1-14
1129	MAT α leu2 ura3 sra1-16
1131	MAT α leu2 ura3 sra1-12
1115	MAT α leu2 ura3

Cepas construidas para este trabajo (ver Sección II M&M)

<i>cepa</i>	<i>genotipo</i>
1121-1c	MAT α leu2 ura3 his3 Δ pep4 sra1-6
1121-4c	MAT α leu2 ura3 his3 Δ pep4 sra1-6
1123-7d	MAT α leu2 ura3 his3 Δ pep4 sra1-15
1123-2b	MAT α leu2 ura3 his3 Δ pep4 sra1-15
1125-1a	MAT α leu2 ura3 his3 Δ pep4 sra1-13
1125-6d	MAT α leu2 ura3 his3 Δ pep4 sra1-13
1127-2b	MAT α leu2 ura3 his3 Δ pep4 sra1-14
1127-3c	MAT α leu2 ura3 his3 Δ pep4 sra1-14

<i>cepa</i>	<i>genotipo</i>
1129-7c	MATa leu2 ura3 his3 Δ pep4 sra1-16
1129-1d	MAT α leu2 ura3 his3 Δ pep4 sra1-16
1131-14a	MATa leu2 ura3 his3 Δ pep4 sra1-12
1131-4b	MAT α leu2 ura3 his3 Δ pep4 sra1-12
1115-1a	MATa leu2 ura3 his3 Δ pep4
1115-2b	MAT α leu2 ura3 his3 Δ pep4
1443	MAT α leu2 ura3 his3 trp1 Δ pep4 sra1-15
1444	MATa leu2 ura3 his3 trp1 Δ pep4 sra1-15
1445	MAT α leu2 ura3 his3 trp1 Δ pep4 sra1-13
1446	MATa leu2 ura3 his3 trp1 Δ pep4 sra1-13
1447	MAT α leu2 ura3 his3 trp1 Δ pep4 sra1-12
1448	MATa leu2 ura3 his3 trp1 Δ pep4 sra1-12
1449	MATa leu2 ura3 his3 trp1 Δ pep4 sra1-16
1450	MATa leu2 ura3 his3 trp1 Δ pep4 sra1-14
1451	MAT α leu2 ura3 his3 trp1 Δ pep4 sra1-14

cepas bacterianas

<i>cepa</i>	<i>genotipo relevante</i>
XL1-Blue (Novablue)	supE hsdR recA lac ⁻ F'[proAB ⁺ lacI ^q lacZ M15 Tn10(tet ^r)]

características: Cepa deficiente para la recombinación. El F'permite el screening (azul/blanco) en X-gal y permite la superinfección con bacteriófago M13 .

MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Células bacterianas competentes

- 200 ml medio LB inoculado con 2 ml de un cultivo O.N.
- crecer hasta una DO₆₀₀ = 0.4-0.5
- sedimentar las células centrifugando 10 min. a 4000 rpm a 4 x C
- tratando las células con suavidad, resuspender en 100 ml de Cl₂Mg 0.1 M.
- centrifugar nuevamente
- resuspender en 50 ml de Cl₂Ca 0.1 M e incubar en hielo 20 min.

- centrifugar nuevamente
- resuspender en 10 ml de Cl_2Ca 0.1 M - glicerol 15%
- separar en alícuotas y almacenar a -70°C .

Transformación de cepas bacterianas:

- Descongelar células competentes y pasar inmediatamente a hielo (no deben quedar a T° ambiente)
- distribuir 50 μl de células para cada reacción y mezclar muy suavemente con el DNA
- incubar la mezcla entre 30 - 60 min en hielo
- incubar 2 min. a 42°C y volver al hielo
- agregar a la mezcla, 1 ml de medio LB e incubar 1 hr. a 37°C , para permitir la expresión de la resistencia -sedimentar las células y resuspender en 200 μl de LB
- plaquear en medio selectivo.

Obtención de ADN plasmídico de cepas bacterianas (miniprep)

Método del hervido

- A partir de una colonia hacer un cultivo de 2 ml en medio selectivo O.N.
- pasar a tubo eppendorf y sedimentar las células centrifugando en microcentrífuga
- resuspender en 350 μl de solución STET de lisis (sacarosa 8%, Tritón X-100 0.5%, EDTA 50mM, Tris-Cl pH:8 50mM)
- agregar 25 μl de lisozima 10 mg/ml (en Tris-ClH 10 mM, pH:8)
- incubar 45 seg. a 100°C
- centrifugar 10 min. a 10000 rpm en microcentrífuga
- descartar el precipitado y agregar 40 μl de acetato de Na 2,5 M (pH:5,2) más 1 vol. de isopropanol, al sobrenadante
- dejar precipitando durante 5 min. a T° ambiente
- centrifugar 10 min. a 10000 rpm en microcentrífuga
- descartar el sobrenadante y lavar con etanol absoluto frío
- secar el precipitado y resuspender en 100-400 μl de H_2O , dependiendo del número de copias en que se encuentra el plásmido por célula
- anlizar el DNA obtenido a través de un gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio.

Elución de ADN del gel de agarosa: Método GENECLEAN.

- Cortar la banda de interés del gel de agarosa,
- agregar 3 volúmenes de solución stock de NaI (6M). Incubar 5 min a 45 °C - 55 °C, para disolver la agarosa.
- Agregar la suspensión de GLASSMILK (matriz de sílica en agua) e incubar 5min.
- Sedimentar el complejo GLASSMILK/DNA por 5 seg y remover el sobrenadante.
- Lavar el pellet 3 veces con solución NEW WASH (NaCl/etanol/agua)
- Eluir el DNA con agua o con un buffer de baja fuerza iónica, incubando a 55°C por 3-5 min. Centrifugar y recuperar el sobrenadante.

Mutagénesis sitio dirigida ver Sección II M&M

Reacción de PCR ver Sección II M&M

METODOS DE GENETICA DE LEVADURAS

Construcción de cepas, análisis de tetradas, ver Sección II M&M

Transformación de levaduras:

Existen diversos protocolos para la transformación de levaduras. El que se describe a continuación es uno de los más eficientes

- Partir de un cultivo YPD crecido O.N.
- Diluirlo a 2×10^6 en medio YPD: volver a crecer hasta alcanzar una densidad de 2×10^7 .
Volumen: 100 ml.
- Centrifugar a 7000 rpm (centrífuga clínica) 5 min.
- Lavar el pellet con 25 ml de agua destilada estéril
- Centrifugar nuevamente
- Resuspender suavemente el pellet en 25 ml de TE/0.1 M LiAc e incubar 30 min. a 30°C con agitación muy suave.
- Centrifugar y resuspender en 1 ml TE/0.1M LiAc
- Combinar 50 µl de células, plásmido (1-5 µg) y 50 µg de DNA de esperma de salmón (opcional).
- Incubar 30 min a 30 °C.

- Agregar 350 µl de 0.1M LiAc/ 40% PEG3350/TE (fresco).
- Incubar durante 30 min a 30 °C (agitación opcional).
- Incubar 5min a 42 °C (heat shock)
- Plaquear en 1 o 2 placas.

Observaciones:

Para cepas termosensibles incubar a 24°C y realizar el heat shock a 37°C.

Es de notar que por cada plásmido a introducir la eficiencia disminuye un orden de magnitud.

PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO PARA ENSAYOS BIOQUÍMICOS

Preparación de extractos:

Levaduras provenientes de cultivos de 4 ml, se resuspenden en 600 µl de buffer de extracción conteniendo fosfato de K 50 mM pH:6.8, EDTA 5 mM, EGTA 3mM, NaCl 120 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, PMSF 1mM, antipaina 3 µg/ml, benzamidina- ClH 1mM. Luego se homogeneizan con 1.2 g de perlas de vidrio (425-600 micrones) en frío. Los restos celulares se eliminan por centrifugación 5 min a 10.000 rpm en microcentrífuga y el sobrenadante se utiliza para mediciones enzimáticas.

Preparación de células permeabilizadas

La permeabilización se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Maggese et al., (1982). Las células provenientes de cultivos incubados 7 hs fueron centrifugadas y resuspendidas en buffer de permeabilización a una concentración de $0,5 \cdot 2 \times 10^9$ cel/ml, se les agregó 150 µl de una mezcla de tolueno:etanol (1:4) y se agitaron durante 5 min en agitador rotatorio; luego se mantuvieron en hielo durante 1 min y se lavaron 3 veces con el mismo buffer.

Cuando la preparación se utilizó para la determinación de PKA las células fueron utilizadas dentro de la hora de realizado el tratamiento de permeabilización; se verificó la eficiencia de permeabilización por tinción con el colorante Tripan Blue.

Preparación de PDE parcialmente purificada

El sobrenadante S10 obtenido como se describe en preparación de PKA parcialmente purificada (M&M Línea 1) se cargó en una resina DEAE-Sepharosa,

equilibrada con buffer GB en una relación de 50 mg de proteína/ml de resina, agitando suavemente con agitador magnético, durante 30 min, a 4° C. Se filtró por Büchner y se lavó con 3 volúmenes de NaCl 0,12 M en GB, durante 15 min, con agitación suave. La resina se recogió nuevamente por filtración y la fracción con actividad fosfodiesterasa se eluyó poniéndola en contacto con dos volúmenes de NaCl 0,25 M en GB, durante 15 min, con agitación suave. Esta fracción se concentró con sulfato de amonio 80% de saturación. Se fraccionó en alícuotas y se congeló a -70 °C.

Sobreexpresión y semipurificación de subunidad regulatoria de PK A

Se inocularon 20 ml de medio YPgál con las cepas indicadas. Luego se cultivaron entre 24 y 48 horas a 30°C en agitador rotatorio. Dado que el medio no es selectivo la sobreexpresión se pierde si se dejan crecer los cultivos por tiempos más prolongados.

Se cosecharon las levaduras mediante centrifugación en tubos de 50 ml, por 5 min. a velocidad máxima en centrífuga clínica. Las células se resuspendieron en 1.5 ml de buffer de extracción. Luego se homogeneizaron con 2 g de perlas de vidrio (425-600 micrones) agitando con vortex durante 3 min con descansos entre min en hielo. Al volumen recuperado se le agregó 1/10 de volumen de sulfato de streptomina 7.5% (p/v). Se agitó y dejó 40 min en hielo. Se pasó a tubos eppendorf. Los restos celulares y ácidos nucleicos se separaron por centrifugación 5 min a 10.000 rpm en microcentrífuga. Se descartó el precipitado y al sobrenadante se le agregó sulfato de amonio saturado de manera de alcanzar una concentración final de 40%. Se agitó y dejó 15 min en hielo y luego se repartió el volumen en tubos eppendorf. Se centrifugó y se guardaron los pellets a -20°C. En algunos casos se hizo una precipitación con sulfato de amonio 80% utilizando el sobrenadante de la precipitación anterior. Dado que se comprobó que tanto la holoenzima como el exceso de R bajan en el corte de 40% se acortó el protocolo hasta este último paso. Los pellets se resuspendieron en 200 µl de buffer GB 1x y se desaló mediante el pasaje de las muestras por columnas de Sephadex G-25 inmediatamente antes de ser usadas para mediciones enzimáticas. Para las determinaciones proteicas se utilizó el método de Bradford, usando BSA como standard.

ENSAYOS BIOQUIMICOS

Medición de actividad fosfodiesterasa

Se siguió el método en dos pasos modificado por Thompson *et al.*, (1976), en la mezcla habitual de ensayo descrita por Kerner *et al.*, (1984), conteniendo buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, 2-mercaptoetanol 2 mM, 50 μ g seroalbúmina bovina, $MgCl_2$ 10 mM, [3H]cAMP 0,1, 1 o 5 μ M según se indique, y la enzima en un volumen final de 0,1 ml. La mezcla se incubó a 30° C durante 20 min, la reacción se detuvo por calentamiento a 100° C durante 1 min. Después de enfriar se agregaron 50 μ g de veneno de serpiente (*Ophiophagus hannah*), se incubó por 10 min a 30° C y se agregó 1,1 ml de una suspensión de Dowex AG1-X2 en metanol 50% (1:2). Luego de dejar 15 min en frío, se centrifugaron los tubos de reacción y se ensayó la radiactividad en 0,5 ml del sobrenadante en mezcla centelleadora de Arkopal-tolueno.

En todos los casos se ajustaron las condiciones de modo que las reacciones fueran lineales con el tiempo y el consumo de sustrato no superara el 30% del total.

Se definió como una unidad enzimática a la cantidad de muestra que cataliza la hidrólisis de 1 pmol de cAMP en 20 min en las condiciones habituales de ensayo.

Medición de actividad de PK A proveniente de extractos crudos

La holoenzima fue determinada ensayando su actividad fosfotransferasa, utilizando kemptido como sustrato. Para anular el efecto de los niveles de cAMP endógeno en el ensayo se realizó una incubación previa con solución de carbón 50 mg/ml en buffer de extracción. Cien μ l de extracto se incubaron con 10 μ l de solución de carbón, durante 5 min en hielo, luego se centrifugó 1 min a 10000 rpm en microcentrífuga y se determinó actividad fosfotransferasa en el sobrenadante. Dado que no se encontraron diferencias por aplicar o no este tratamiento se continuó prescindiendo del mismo.

El ensayo fue idéntico al descrito anteriormente para la medición de actividad quinasa L1, utilizando solo kemptido como sustrato.

Todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado y se usaron además muestras de tres experimentos independientes en los cuales se utilizaron para la germinación, esporas provenientes de diferentes preparaciones.

Se definió unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 nmol de fosfato a kemptido en 1 min a 30° C.

Medición de actividad de PK A en células permeabilizadas

La medición de actividad se realizó en alícuotas conteniendo 2×10^6 células, la mezcla de reacción fue similar a la descrita en el ítem al anterior, el tiempo de incubación fue de 2 min a 30°C . Terminada la incubación se agregó seroalbúmina bovina a una concentración final de 10 mg/ml, se hirvió durante 30 seg y se centrifugó inmediatamente. Se sembraron alícuotas de los sobrenadantes en papeles de fosfocelulosa como se ha descrito anteriormente.

Determinación de actividad de la subunidad R en extractos crudos

Las bases del método son las descritas anteriormente para la Línea 1.

Alícuotas de extracto crudo (40-80 μg de proteína) fueron incubadas 20' a 30°C en presencia de 0.1, 0.3, 1 ó $3 \mu\text{M}$ [^3H]cAMP (10^4 cpm/pmol), 0.5 M NaCl, 15 mM Tris/HCl, pH 7.4. Se filtraron las muestras a través de nitrocelulosa y se contaron en contador de centelleo líquido.

Velocidad de disociación de [^3H]cAMP unido

Se incubó una concentración de 40 nM de sitios capaces de unir cAMP en presencia de [^3H]cAMP 0.2 μM en un volumen final de 50 μl , durante 30 min a 4°C . La reacción de disociación se inició diluyendo cada incubación en 2 ml de buffer "OR" conteniendo cAMP frío 10 μM , BSA 0.15 mg/ml, DTT 1mM y NaCl 0.15 M. A distintos tiempos se fueron separando alícuotas que se mezclaron con 9 volúmenes de una solución fría de sulfato de amonio 3.2 M (Døskeland et al, 1977). El precipitado resultante fue recogido por filtración , lavando la membrana 3x3 ml con sulfato de amonio 65% frío. Los filtros fueron luego transferidos a viales conteniendo 1 ml de solución de SDS 2%. Luego de agitarlos se agregó 7 ml de solución de centelleo.

Medición de la liberación de [^3H]cAMP unido inducida por C.

El ensayo es esencialmente igual al descrito para la medición de la velocidad de disociación con la diferencia de que la reacción de disociación se inicia en presencia de concentraciones crecientes de subunidad C, a un tiempo fijo, en que la liberación en ausencia de C sea cercana al 50%. Se utilizó subunidad catalítica pura de origen bovino, gentilmente cedida por el laboratorio del Dr. Døskeland.

Curvas de competencia con análogos de cAMP selectivos de sitio

El ensayo se inició agregando las muestras de R semipurificadas a una mezcla de incubación conteniendo [3 H]cAMP 1 μ M (10^4 cpm/pmol), 0.5 M NaCl, 15 mM Tris/HCl, pH 7.4 y concentraciones crecientes (0-100 μ M) de los análogos. Se eligieron dos análogos, el N⁶-benzoil-cAMP (clásicamente de sitio A) y el 8-bencilamino- cAMP (clásicamente de sitio B). Se incubó ON a 4°C y se procedió luego tal como se ha indicado previamente para el ensayo de medición de actividad ligante de cAMP.

CORRIDA EN SDS-PAGE

Se usaron mini-geles de poliacrilamida de poro 10% para el gel separador y 4% para el concentrador siguiendo la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras fueron mezcladas con un volumen adecuado de buffer de siembra y hervidas a 100°C durante 2 min. Las corridas se hicieron en buffer de corrida con voltaje constante de 100-150 voltios, a temperatura ambiente. Cuando los geles no fueron transferidos a nitrocelulosa se los tiñó para visualizar las proteínas con la solución teñidora de Coomassie-Blue y se destiñeron con la solución decolorante, luego fueron secados al vacío y por calor.

WESTERN-BLOT**Transferencia**

Después de la corrida electroforética los geles de poliacrilamida fueron sometidos a electrotransferencia, con buffer de transferencia durante 1h 30 min a 55 volts. Se utilizó membrana de PVDF.

Revelado**a) Tinción para proteínas**

Después de la transferencia se tiñeron las membranas con una solución de rojo Ponceau S (0.5% en acético 1%), seguida de lavados con agua destilada. Se registraron las posiciones de los marcadores de PM y se procedió a los pasos de bloqueo y revelado.

b) Revelado con anticuerpos

Las membranas de nitrocelulosa transferidas se incubaron durante 60 min con la solución de bloqueo a temperatura ambiente y agitación continua. Luego se reemplazó

esta solución por solución de bloqueo fresca conteniendo el primer anticuerpo diluido. Se incubó durante 1.5 h a temperatura ambiente con agitación continua u ON a 4°C. Luego se lavó 3 veces con solución de bloqueo y se incubó durante 1.5 h con el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa. Posteriormente se realizaron otros 3 lavados con solución de bloqueo y dos más con TBS. Finalmente se reveló con el sistema de revelado de quimioluminiscencia (ECL).

El primer anticuerpo fue el BCY1(yN-19) de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Este anticuerpo es un policlonal generado en cabra contra el péptido que comprende los primeros 19 residuos del extremo amino terminal de la proteína Bcy1 de *S.cerevisiae*. Este fue usado a una dilución 1/500 respecto de la su madre provista por la empresa.

El segundo anticuerpo fue anti cabra acoplado a peroxidasa y también fue diluido 1/500.

TÉCNICAS GENERALES

DETERMINACION DE PROTEINAS

Las proteínas solubles se dosaron por el método de Bradford (1976), usando seroalbúmina bovina como patrón.

MEDICION DE LA RADIATIVIDAD (Radiación beta)

Se determinó en contador de centelleo líquido, usando mezcla centelleadora de tolueno. Para las muestras en soluciones acuosas se usó una mezcla de tolueno-Arkopal N 100 (3:1) (v/v).

La mezcla centelleadora de tolueno contiene 0,1 gr de dimetil POPOP[1,4 bis 2(4-metil-5-feniloxazolilbenceno)] y 4 gr de PPO (2,5-difeniloxazol) en un litro de tolueno.

BUFFERS

Buffer GB 1x

Tris-HCl 10 mM, pH7,4
2-mercaptoetanol 10mM
EDTA 1mM
EGTA 1 mM
p-metil- sulfonil fluoruro 0,5 mM

Buffer de extracción

K₂HPO₄-KH₂PO₄ 50 mM, pH 6,8
EDTA 5 mM
EGTA 3 mM
NaCl 120 mM
2-mercaptoetanol 10 mM
p-metilsulfonilfluoruro 1mM
antipalína 3 µg/ml
benzamidina 1 mM

Buffer de dilución

K₂HPO₄-KH₂PO₄ 50 mM,pH 6,8
EDTA 5 mM
EGTA 3 mM
2-mercaptoetanol 10 mM
Seroalbúmina bovina 0,9 mg/ml

Buffer de permeabilización

Tris HCl 50 mM, pH 7,4
EGTA 1mM
EDTA 3mM
2-mercaptoetanol 10mM
benzamidina 1mM
p-metilsulfonilfluoruro 1 mM

Buffer de corrida:

glicina 1.5%
Tris base 0.3%
SDS 0.1%

Buffer de transferencia:

glicina 1.5%
Tris base 0.3%
Metanol 20%

Buffer TBS

Tris-HCl, pH: 8
NaCl 150 mM

Solución de bloqueo:

Leche descremada 5%, Tween 20 0.1% en TBS 1X

Medios:

Medio LB: -bacto peptona 1% -extracto de levadura 0.5% -NaCl 0.5%

Medio LB-amp: -medio LB + ampicilina 100 µg/ml

Medio YPglu : -extracto de levadura 1% - peptona 2% -glucosa 2%

Medio YPgal: -extracto de levadura 1% - peptona 2% -galactosa 2%

Medio YPEG: -extracto de levadura 1% -peptona 2% -etanol 2%(v/v) -glicerol 3%(v/v)

Medio mínimo SD: -yeast nitrogen base 0,67% sin aminoácidos -glucosa 2%
adiciones según auxotroflas: L-histidina-ClH 20 µg/ml, L-leucina 60 µg/ml, L-triptofano 40 µg/ml, uracilo 20 µg/ml.

Medio de esporulación: -acetato de potasio 1% -extracto de levadura 0.1% -
dextrosa 0.05%

Medio sólido: Se agrega 2% agar.

Medio YPG : -0,3% de extracto de levadura, 1% de peptona, 3% de glucosa

REACTIVOS

Los sustratos peptídicos y el péptido básico derivado de la caseína kinasa 2 (65-86) fueron gentilmente provistos por el laboratorio del Dr. Lorenzo Pinna (Universidad de Padua, Italia).

El [^3H]cAMP (Actividad específica 30 Ci/mmol), y el [γ - ^{32}P]ATP fueron de New England Corp.

Las resinas DEAE-Sepharosa y Sephadex G-25, los inhibidores de proteasas, el kemptido, el PKI₆₋₂₂, la polilisina (peso molecular promedio de 46kDa), el veneno de serpiente (*Ophiophagus hannah*), la seroalbúmina bovina cristalina fracción V (BSA), el Tris, la sacarosa, el EDTA, el EGTA, el PPO, el dimetil POPOP, las perlas de vidrio, los análogos de cAMP, la leucina, uracilo, histidina, adenina, triptofano, la agarosa, el bromuro de Etidio y el 2-mercaptoetanol fueron de Sigma Chemical Co.

El YNB sin aminoácidos y el bacto-agar fueron de DIFCO.

El sulfato de amonio y el cloruro de sodio fueron de Carlo Erba. El papel de fosfocelulosa fue Whatman P-81. La nitrocelulosa de 0,45 μm fue de Micron Separating Inc.

Los anticuerpos y el reactivo para revelar por quimioluminiscencia "luminol" fueron de Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Las enzimas de restricción fueron de Promega; la Taq polimerasa, aceite mineral, ligasa de T4 y los marcadores lambda EcoR1-HindIII / EcoR1 fueron de Gibco BRL.

El kit GENE CLEAN II fue de Bio 101 Inc.

El resto de los reactivos fue de grado analítico.

Materiales y métodos

Sección 2

ESTRATEGIA DE CLONADO de cada variante *bcy1* en vectores de expresión en levaduras

Se diseñó una estrategia de clonado (Figura 40) para lograr los siguientes objetivos:

- Subclonar el gen *BCY1* salvaje y las variantes alélicas mutadas *bcy1* en un vector shuttle (levadura-*E.coli*) de manera tal que su expresión sea inducible en levadura. El vector elegido fue el YEp51, de alto número de copia y que posee el promotor GAL10 (que responde a la presencia de galactosa en el medio) río arriba del sitio de clonado *Nco1*.
- Subclonado del gen *BCY1* salvaje en el vector pCB-GST de manera tal que la subunidad regulatoria quede fusionada a la GST. Esta construcción se usará para la purificación de subunidades C, en una etapa posterior a esta Tesis.

Para generar el sitio *Nco1* en *BCY1* de manera tal que comprometa al primer AUG, se realizó una mutagénesis sitio dirigida. Por otra parte, las variantes mutadas *bcy1* fueron subclonadas en Bluescript SK. Posteriormente los fragmentos *BspE1-EcoR1*, conteniendo las diferentes mutaciones, fueron intercambiados en la construcción *BCY1(Nco1)-BluSK*. Finalmente, tanto el gen salvaje como las versiones mutadas fueron introducidos en el vector shuttle elegido.

Por otro lado se subclonó el gen *PDE2* (que codifica para la fosfodiesterasa de alta afinidad) en un vector shuttle (levadura-*E.coli*) de alto número de copia, para su sobreexpresión.

Se construyeron también cepas *bcy1* receptoras, pertinentes para cada construcción.

Se detallan a continuación los resultados obtenidos en cada uno de estos puntos.

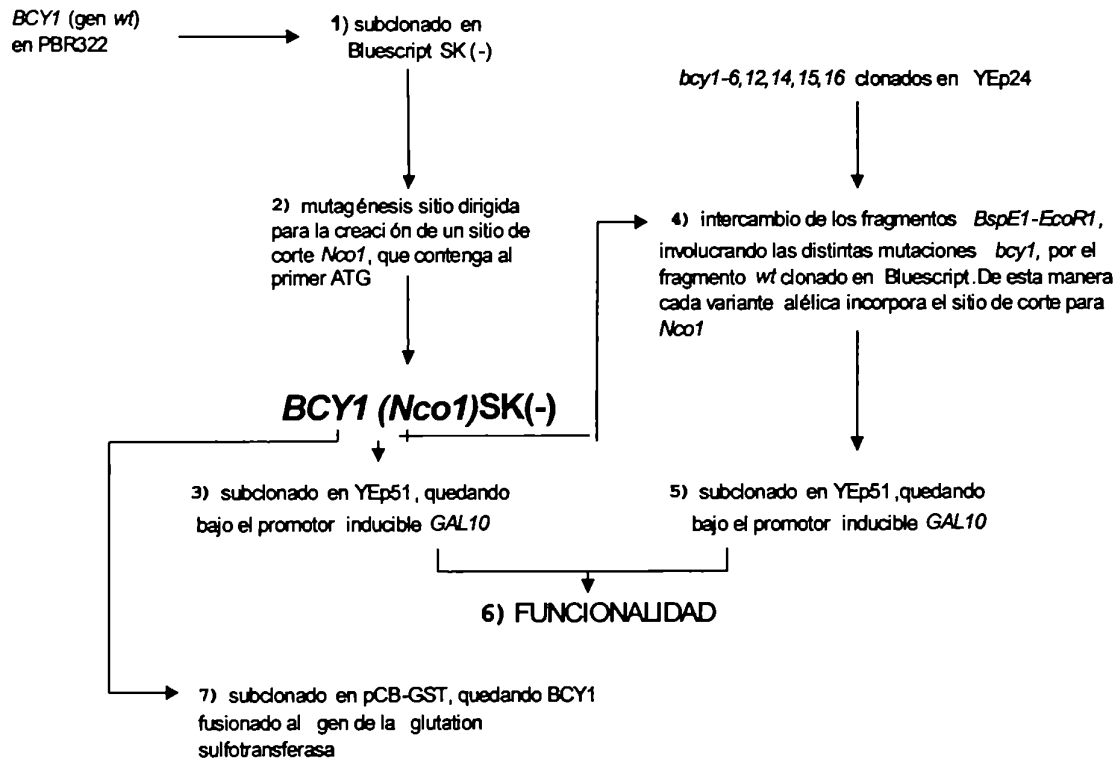
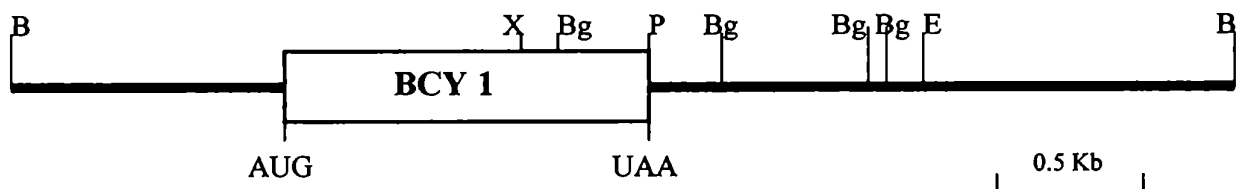


Figura 40- Esquema de la estrategia de clonado

1-Subclonado del gen *BCY1* salvaje en *Bluescript SK (-)*

Se partió de un fragmento conteniendo el gen *BCY1* clonado en el sitio *BamH1* del pBR322.

Mapa:



B= *BamH1*; X= *Xba1*; Bg= *Bgl2*; P= *Pst1*; E= *EcoR1*

Se eligió el vector Bluescript SK (-) para el subclonado del fragmento *Bam*H1-*Eco*R1 de 2.9 kb incluyendo *BCY1* dado que era adecuado para la realización de la posterior mutagénesis sitio dirigida.

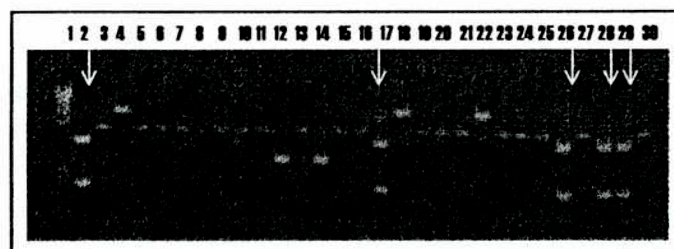


Se digirieron las muestras de DNA de interés con *Bam*H1 y *Eco*R1, se sembraron en un gel de agarosa 1% preparativo y los fragmentos de interés fueron eluidos por el método del GeneClean, según se especifica en M & M. Se calculó luego la concentración de ambos mediante un gel analítico y se procedió a la reacción de ligado, usando:

- 9 ng *BCY1*-pBR322 (*Bam*H1-*Eco*R1)
- 3 ng Bluescript SK (-)(*Bam*H1-*Eco*R1)
- T4 DNA ligasa
- volumen final de incubación: 10 µl; incubación ON a 16°C

E. coli XL1-Blue fue transformada con la mezcla de ligación; se hicieron minipreparaciones plasmídicas de 29 colonias resistentes a ampicilina y se analizó el patrón de restricción para la enzima *Xba*I (Figura 41). Aquellas muestras que presentaron el patrón esperado fueron digeridas doblemente con *Bam*H1-*Eco*R1 y en todos los casos liberaron el fragmento del tamaño esperado

Figura 41- Gel agarosa 1% teñido con BrEt. Calle1 Marcador PM λ Hind III (23 Kb, 9.4 Kb, 6.6 Kb, 2.3 Kb, 2 Kb). Calles 2-30 minipreparaciones plasmídicas de las colonias 1-29 resistentes a ampicilina cortadas con *Xba*I.



Patrón esperado

— 4 Kb

— 1.8 Kb

Se seleccionaron finalmente las colonias 1, 16, 25, 27 y 28, indicadas con la flecha.

2- Mutagénesis sitio dirigida para la creación de un sitio de corte *Nco*I que contenga al primer ATG del gen *BCY1*

Para poder subclonar el gen *BCY1* en el vector YEp51 y pCB-GST, descriptos más adelante, se generó un sitio de reconocimiento para corte con *Nco*I, por medio de mutagénesis sitio dirigida usando un método basado en el desarrollado por Kunkel (Kunkel et al, 1987) que facilita una fuerte selección en contra de la cadena no mutagenizada de un DNA doble cadena. Los principales pasos realizados se describen a continuación:

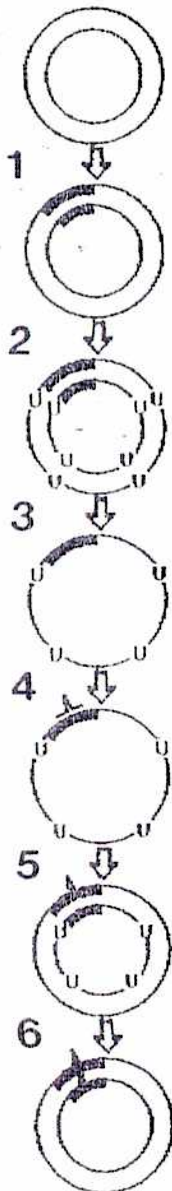
secuencia de reconocimiento para *Nco*I: CCATGG

secuencia a mutar:

GTAAGAATAAACG ATG GTA TCT TCT
* Met Val Ser Ser

Oligonucleótido seleccionado:

GTAAGAATAAACCATGGTATCTTCT



1. *BCY1* clonado en Bluescript SK (-)

2. transformación de la cepa CJ236 (*dut ung*). Cuando una molécula de DNA se sintetiza en esta cepa bacteriana el DNA naciente incorpora uracilos en lugar de algunas timinas como resultado de la mutación *dut* que inactiva la enzima dUTPasa aumentando los niveles intracelulares de dUTP. La mutación *ung* inactiva la uracil-N-glicosilasa, permitiendo que el uracilo incorporado permanezca en el DNA.

3. infección con fago "helper", aislamiento de fagémidos y extracción de DNA simple cadena

4. hibridización con el oligonucleótido que lleva la mutación

5. síntesis de la cadena de DNA complementaria, usando el oligonucleótido como primer. Ligación con T4 DNA ligasa para permitir la formación de DNA ccc (circulo covalentemente cerrado) Análisis del producto en un gel de agarosa 1% conteniendo 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Este se une al ccc simple cadena (ss) relajado provocando un superenrollamiento positivo. Esta condensación hace que el DNA migre más rápidamente en el gel. La reacción de síntesis de la segunda cadena tiene como resultado la formación de DNA ccc relajado y por lo tanto la aparición de una banda que migra más lentamente que el plásmido de DNA ss indica la producción exitosa de ccc doble cadena

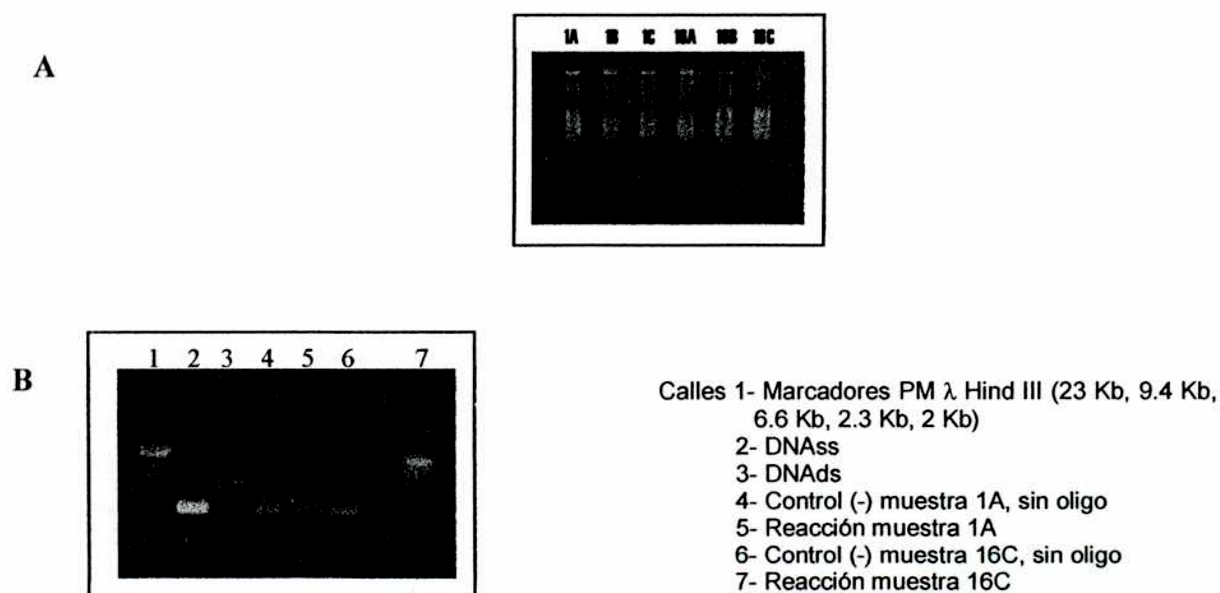
6. transformación de XL1-Blue. La enzima uracil-N-glicosilasa funcional inactiva la cadena parental que posee uracilos y de esta manera solo la cadena mutada se replica. Minipreparación plasmídica y posterior análisis del material obtenido

Pasos 1-3

Se llevaron a cabo usando las preparaciones provenientes de las colonias 1 y 16, por triplicado.

Se obtuvo finalmente DNAss como se muestra en la Figura 42. Se seleccionaron dos muestras de DNA para realizar los pasos 4-6 (1A y 16C)

Figura 42- Gel agarosa 1% teñido con BrEt. Muestras obtenidas del paso 3 (A) y del paso 5 (B) del protocolo de mutagénesis



Se transformaron bacterias XL1-Blue con el material proveniente de la reacción 16C y se analizó el patrón de restricción que presentaban 8 muestras de colonias independientes cortadas con NcoI (Figura 43). Siete dieron el patrón esperado. Se descartó la muestra de la calle 10.

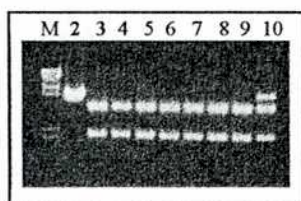


Figura 43- Gel agarosa 1% teñido con BrEt. M = Marcadores PM λ Hind III (23 Kb, 9.4 Kb, 6.6 Kb, 2.3 Kb, 2 Kb), calle 2 construcción sin mutagenizar cortado con Nco1, calles 3-10 material proveniente de colonias resistentes a ampicilina cortado con Nco1.

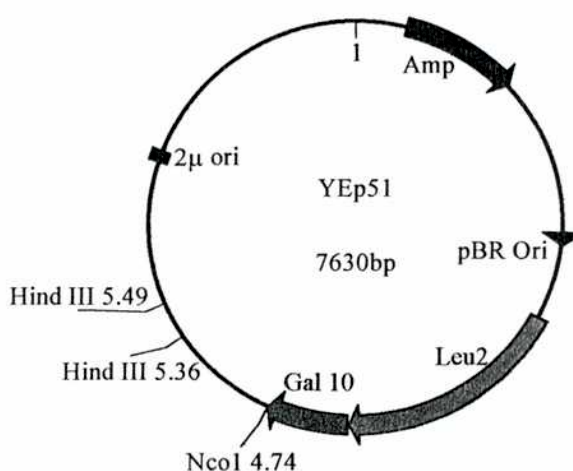
3- Subclonado de BCY1 en YEp51 quedando bajo el promotor inducible GAL-10

Partiendo de la construcción *BCY1(Nco1)*-SK se procedió al subclonado del fragmento *Nco1-HindIII* de 2.15 kb, que contiene al gen *BCY1*, en el vector shuttle YEp51.

A continuación se detallan las características relevantes que éste presenta:

- vector shuttle capaz de replicarse tanto en *S.cerevisiae* como en *E.coli*
- el gen clonado en el sitio *Nco1* queda bajo el promotor fuerte *GAL10* inducible por galactosa
- marcador de selección en *E.coli* : resistencia a ampicilina
- marcador de selección en levaduras: gen *LEU2*.

Mapa:



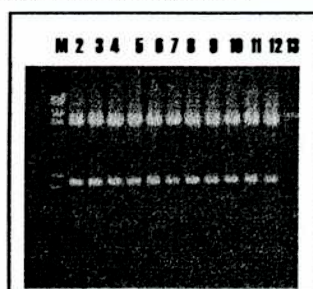
Luego de cortar YEp51 y *BCY1(Nco1)*-SK con *Nco1* y *HindIII*, se sembraron las muestras en un gel preparativo de agarosa 1% y los fragmentos de interés fueron eluidos por el método del GeneClean, según se describe en M&M. A continuación se calcularon las concentraciones de ambos DNAs a ligar mediante un gel analítico y se procedió a la

reacción de ligación. Después de intentar la ligación usando cantidades pequeñas de vector (aprox 5ng), sin éxito, se fijó esta variable en 50 ng y se ensayaron las siguientes relaciones molares inserto/vector:

relación (i/v)	vector (ng)	inserto (ng)	n° de colonias
1:1	50	14	100
3:1	50	42	50
5:1	50	70	120
10:1	50	140	25

Se utilizó DNA-ligasa de T4 en un vol final de incubación de 10 μ l y se incubó O.N. a 16°C. Para las ligaciones de las demás construcciones *bcy1*-SK se decidió utilizar la relación 1:1, en base a los resultados obtenidos, ya que presentó una buena eficiencia y es la que requiere la mínima cantidad de material. *E.coli* Novablue fue transformada con las mezclas de ligación; se hicieron mini-preparaciones plasmídicas de varias colonias que resultaron ser resistentes a ampicilina y se analizó el patrón de restricción para las enzimas *Nco1*-*Hind III* donde se esperan dos bandas, una correspondiente al vector (6.8 Kb) y otra al inserto liberado (2.16 Kb) (Figura 44).

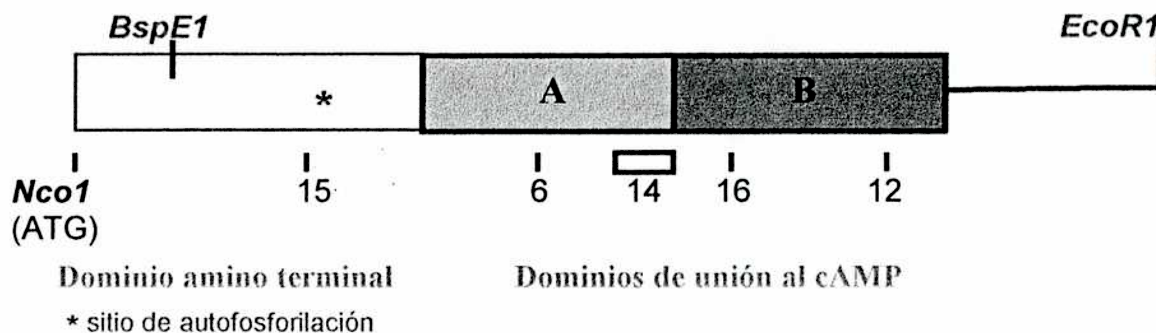
Figura 44- Gel agarosa 1% teñido con BrEt. M = Marcadores PM λ *Hind III* (23 Kb, 9.4 Kb, 6.6 Kb, 2.3 Kb, 2 Kb), calles 2-12 material proveniente de colonias resistentes a ampicilina cortado con *Nco1*-*Hind III*, 13= YEp51 cortado con las mismas enzimas



Los patrones encontrados coincidieron con los esperados, en todos los casos.

4- Intercambio de los fragmentos *BspE1*-*EcoR1*

Con el objeto de obtener un fragmento capaz de contener todas las mutaciones *bcy1* anteriormente descritas, se analizaron las posibilidades de corte dentro del inserto que contiene al gen *BCY1* (*Nco1*) clonado en Bluescript y se decidió utilizar las enzimas *BspE1* y *EcoR1* que cortan en las posiciones 471 y 2436 respectivamente.

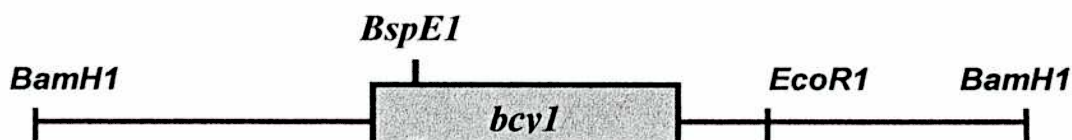


Se partió de las variantes *bcy1* mutadas clonadas en el sitio *BamH1* del vector shuttle YEp24, gentilmente cedidas por el Dr. K. Tatchell.

A continuación se presenta un esquema del inserto conteniendo las variantes *bcy1*.

Inserto:

Tamaño: 4.2 kb.



El patrón de corte esperado para el YEp24 conteniendo el fragmento *BamH1* de 4.2 kb luego de digerir con *BspE1* y *EcoR1* es el siguiente:

BspE1-*EcoR1*

2.8
2.6
2.3
2.2
1.9 ⇒ fragmento de interés

Sin embargo en el patrón obtenido las bandas de 2.6 y 2.3 kb se convirtieron en una de 4.9 kb debido a la presencia de una secuencia para metilación del tipo *Dam* en el sitio de corte para *BspE1* en YEp24.

Dado que el fragmento a aislar de 1.9kb corre cercano al de 2.2kb se digirió también con la enzima *Ssp1*, que convierte dicho fragmento en dos, de 0.8 y 1.4 kb.

Por otra parte, la construcción *BCY1(Nco1)*-SK fue digerida con *BspE1* y *EcoR1*

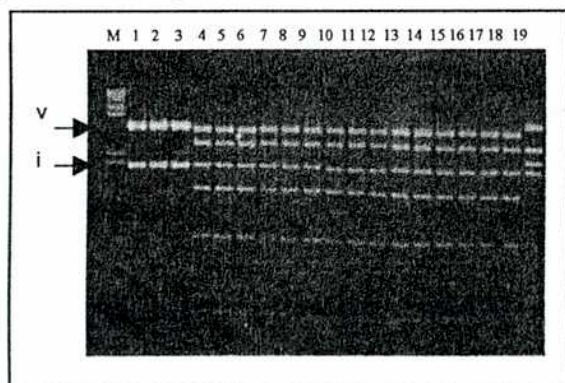
Luego del corte con las enzimas indicadas las muestras fueron sembradas en un gel de agarosa 1%. Se visualizaron las bandas por tinción con Bromuro de Etidio. Los fragmentos de interés fueron eluidos por el método del Geneclean, según se indica en materiales y métodos.

A continuación se presenta el gel preparativo (Figura 45) a partir del cual se aislaron los fragmentos de interés para la posterior ligación. En éste se puede observar el patrón antes discutido, después de una doble digestión (calle 19 vs 4-6). Es notoria la diferencia de tamaño que presentan, a la altura del fragmento de 1.9kb, las calles correspondientes a *bcy1-14* (calles 10, 11, 12), dado que esta mutación corresponde a una delección de 42pb.

vector $\Rightarrow$ 3.9 kb

inserto $\Rightarrow$ 1.9 kb

Figura 45- Gel agarosa 1% teñido con BrEt



M-Marcadores PM λ Hind III (23 Kb, 9.4 Kb, 6.6 Kb, 2.3 Kb, 2 Kb)

Calles 1-3- *BCY1(Nco1)*-SK *BspE1*-*EcoR1*
 4-6- *bcy1-6* YEp24 *BspE1*-*EcoR1*-*Ssp1*
 7-9- *bcy1-12* YEp24 *BspE1*-*EcoR1*-*Ssp1*
 10-12- *bcy1-14* YEp24 *BspE1*-*EcoR1*-*Ssp1*
 13-15- *bcy1-15* YEp24 *BspE1*-*EcoR1*-*Ssp1*
 16-18- *bcy1-16* YEp24 *BspE1*-*EcoR1*-*Ssp1*
 19- *bcy1-6* YEp24 *BspE1*-*EcoR1*

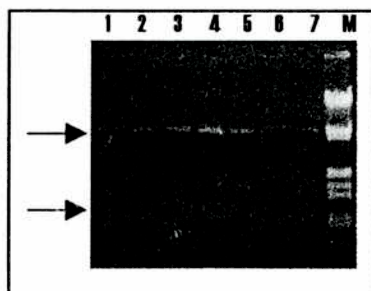
Mediante un gel analítico se calcularon las concentraciones de ambos DNAs a ligar y se procedió a la reacción de ligación. Se ajustaron las condiciones de ligación, en principio, con el fragmento que contenía la mutación *bcy1-14*. Se eligió una relación molar de 3:1 inserto/vector .

Reacción de ligado:

- 8 ng *BCY1(Nco1)*-SK (vector)
- 12 ng fragmento *bcy1-14* (inserto)
- DNA-ligasa de T4
- volumen final de incubación: 10 µl; incubación O.N. a 16°C

E.coli Novablue fue transformada con la mezcla de ligación; se hicieron mini-preparaciones plasmídicas de varias colonias que resultaron ser resistentes a ampicilina y se analizó el patrón de restricción para las enzimas *Pst1* y *Xho1* (Figura 46). En todos los casos se encontró el patrón esperado.

Figura 46- Gel agarosa 1% teñido con BrEt. M = Marcadores PM λ *EcoR1-Hind III* (21 Kb, 5.1 Kb, 4.9 Kb, 4.3 Kb, 3.5 Kb, 2Kb, 1.9 Kb, 1.5Kb, 1.3 Kb, 0.9 Kb, 0.8 Kb, 0.5 Kb), calles 1-7 material proveniente de colonias resistentes a ampicilina cortado con *Pst1-Xho1*.

**5-Subclonado de las variantes *bcy1* en YEp51**

Partiendo de las construcciones *bcy(Nco1)*-SK se procedió al subclonado del fragmento *Nco1-HindIII* de 2.15 kb, que contiene las variantes *bcy1*, en el vector shuttle YEp51. Las características relevantes de este vector ya han sido presentadas en el punto 3.

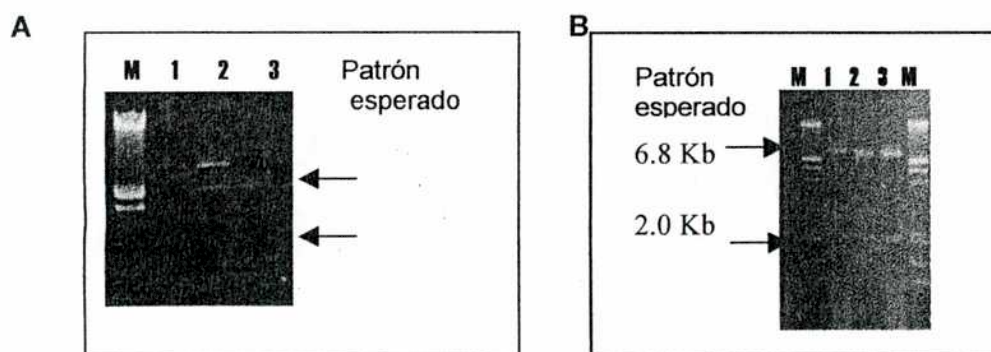
Luego de cortar YEp51 y *bcy1(Nco1)*-SK con *Nco1* y *HindIII*, se sembraron las muestras en un gel preparativo de agarosa 1% y los fragmentos de interés fueron eluidos por el método del Geneclean, según se describe en materiales y métodos. A continuación se calcularon las concentraciones de ambos DNAs a ligar mediante un gel analítico y se procedió a la reacción de ligación.

Se utilizó T4 DNA-ligasa en un vol final de incubación de 10 µl y se incubó O.N. a 16°C. Se decidió utilizar la relación molar 1:1, en base a los resultados obtenidos en el punto 3, ya que presentó una buena eficiencia y es la que requiere la mínima cantidad de material. *E.coli* Novablue fue transformada con las mezclas de ligación; se hicieron mini-preparaciones plasmídicas de varias colonias que resultaron ser resistentes a ampicilina y se analizó el patrón de restricción para la enzima *Pst1*. Posteriormente se analizó el patrón de restricción para la doble digestión *Nco1-HindIII*

para la muestra donde se encontró el patrón correcto con *Pst*I. A modo de ilustración se muestran los resultados obtenidos con la variante *bcy1-14* (Figura 47).

Figura 47- Gel agarosa 1% teñido con BrEt. M = Marcadores PM λ *Eco*R1-*Hind* III (21 Kb, 5.1 Kb, 4.9 Kb, 4.3 Kb, 3.5 Kb, 2Kb, 1.9 Kb, 1.5Kb, 1.3 Kb, 0.9 Kb, 0.8 Kb, 0.5 Kb)

A- calles 1-3 material proveniente de colonias resistentes a ampicilina cortado con *Pst*I.
B- calles 1-3 material = calle 3 del panel A cortado con *Nco*I- *Hind* III.



La integridad de la construcción se analizó también, mediante PCR con primers específicos. Dado que la mutación *bcy1-14* consiste en una delección de 42 pb el fragmento amplificado corre ligeramente más rápido que el control *wt*. El fragmento amplificado corresponde al gen entero y tiene un tamaño de 1250 pb.

Reacción de PCR

Primers utilizados:

PRIMER 1

5' CCCGAATTCG ATG GTA TCT TCT 3'

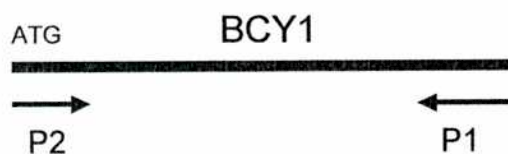
EcoRI

PRIMER 2

5'CCCCTCGAG ATG TCT TGT AGG 3'

XhoI

Esquema:



Las condiciones óptimas encontradas para la reacción de PCR con estos primers se detallan a continuación:

	concentración final
buffer de reacción <i>Taq</i>	1x
primer 1	10 pmoles
primer 2	10 pmoles
dNTPs mezcla	0.4 mM (c/u)
Cl ₂ Mg	4 mM
<i>Taq</i> DNA pol	2.5 U
H ₂ O c.s.p 48 µl	

-Agregar a los 48 µl de mezcla de reacción, 2µl de DNA templado

Programa utilizado:

1- 10 min. a 95°C (desnaturalización)

2- 35 ciclos de:

-1 min. a 95°C

-1 min. a 40°C

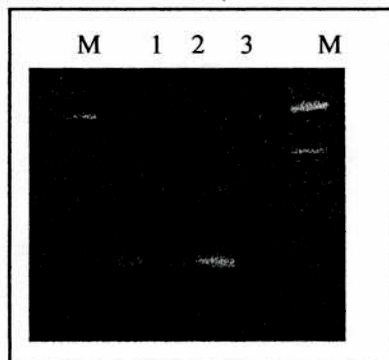
-1 min. a 72°C

3-10 min. a 72°C

4-mantener a 4°C.

Se analizaron los productos de la reacción a través de corrida en gel de agarosa 1% y posterior tinción con BrEt (Figura 48).

Figura 48- Gel agarosa 1% teñido con BrEt. M = Marcadores PM λ *EcoR1-Hind III* (21 Kb, 5.1 Kb, 4.9 Kb, 4.3 Kb, 3.5 Kb, 2Kb, 1.9 Kb, 1.5Kb, 1.3 Kb, 0.9 Kb, 0.8 Kb, 0.5 Kb), calle 1 BCY1-YEp51, calle 2 bcy1-14-YEp51, calle 3= 1+2 (se observa un doblete)3.



Sobreexpresión y funcionalidad in vivo

Los resultados de la sobreexpresión de las distintas construcciones y su funcionalidad *in vivo* se presentan en la Sección Resultados:

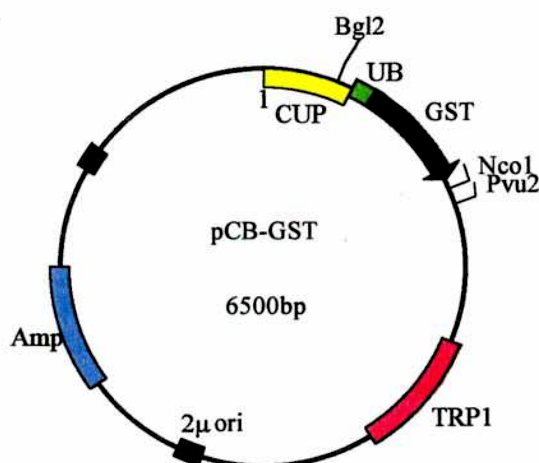
1. *Análisis fenotípico*
2. *Análisis por SDS-PAGE*
3. *Determinación actividad binding de [3 H]cAMP*
4. *Western-blot*

7- Subclonado de BCY1 en pCB-GST quedando fusionado a GST, bajo el promotor inducible CUP1

Partiendo de la construcción *BCY1(Nco1)*-SK se procedió al subclonado del fragmento *Nco1-EcoRV* de 2.15 kb, que contiene al gen *BCY1*, en el vector shuttle pCB-GST. A continuación se detallan las características relevantes que éste presenta:

- vector shuttle capaz de replicarse tanto en *S.cervisiae* como en *E.coli*
- el gen clonado en el sitio *Nco1* queda adyacente al gen de la glutation-sulfotransferasa (GST) de manera que al expresarse se genera una proteína de fusión. La porción GST se encuentra fusionada al extremo carboxi-terminal de la ubiquitina (UB). Esta fusión preserva la integridad de la proteína protegiéndola de proteólisis endógena. Este extremo es removido tempranamente, quedando la proteína de fusión con GST:
- el sistema se encuentra bajo las órdenes del promotor inducible por cobre, CUP1. También posee la secuencia terminadora de CYC1.
- marcador de selección en *E.coli* : resistencia a ampicilina (Amp)
- marcador de selección en levaduras: gen *TRP1*.

Mapa:

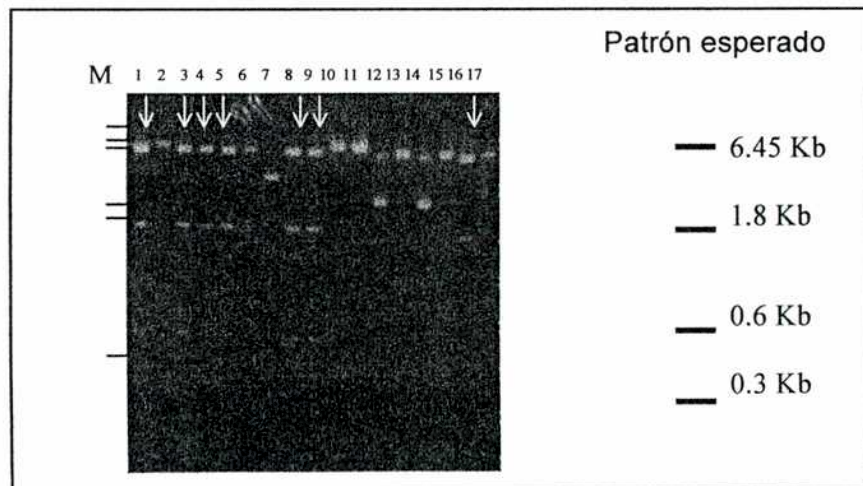


Luego de cortar *BCY1(Nco1)*-SK con *Nco1* y *EcoRV* y el vector pCB-GST con *Nco1* y *Pvu2* se sembraron las muestras en un gel preparativo de agarosa 1% y los fragmentos de interés fueron eluidos por el método del GeneClean, según se describe

en M&M. A continuación se calcularon las concentraciones de ambos DNAs a ligar mediante un gel analítico y se procedió a la reacción de ligación.

Se utilizó DNA-ligasa de T4 en un vol final de incubación de 10 μ l y se incubó O.N. a 16°C y se utilizó una relación molar inserto / vector de 1:1. *E.coli* Novablue fue transformada con las mezclas de ligación; se hicieron mini-preparaciones plasmídicas de varias colonias que resultaron ser resistentes a ampicilina y se analizó el patrón de restricción para el corte con Bgl2 (Figura 49).

Figura 49- Gel agarosa 1% teñido con BrEt. M = Marcadores PM λ Hind III (23 Kb, 9.4 Kb, 6.6 Kb, 2.3 Kb, 2 Kb, 0.5 Kb)), calles 1-16 material proveniente de colonias resistentes a ampicilina cortado con *Bgl*2, 17= pCB-GST cortado con la mismas enzima.



Se seleccionaron las colonias 1, 3, 4, 5, 8, 9 y 16.

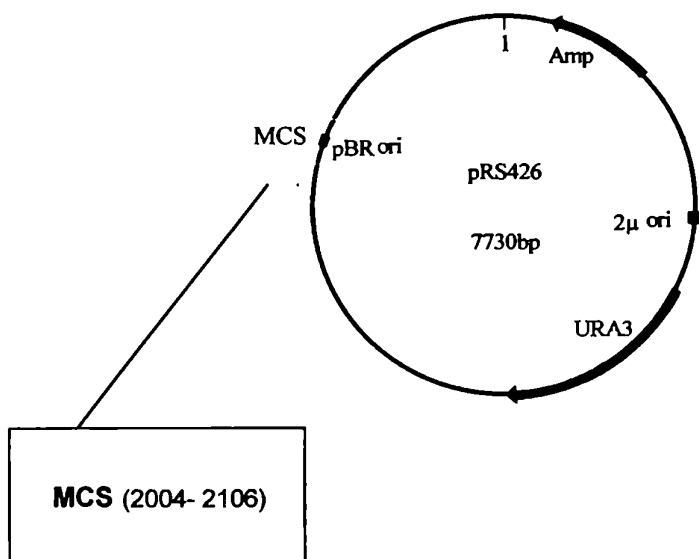
Sobreexpresión de la fosfodiesterasa (PDE2/SRA5) de baja Km en cepas que presentan mutaciones en la subunidad R (BCY1) de la PK A y análisis del rol que los niveles de cAMP juegan en el desarrollo de fenotipos que caracterizan estas cepas.

Subclonado del gen PDE2 en un vector multicopia

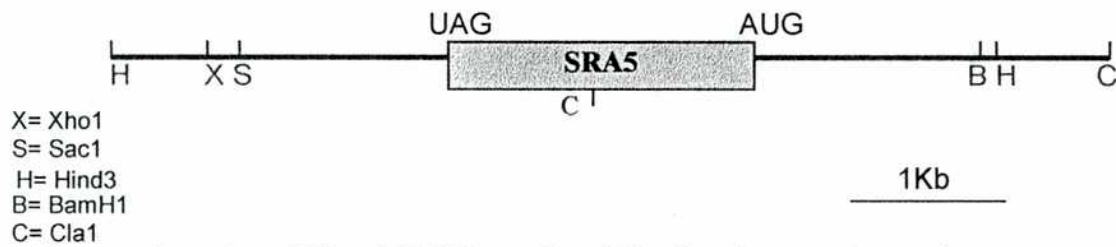
Se utilizó como punto de partida el gen *PDE2* clonado en YCp50 (pW3), (Wilson & Tatchell, 1988). Se seleccionó el vector pRS426 para el subclonado del fragmento *BamH1-Sac1* de 4.6 kb incluyendo *PDE2*. A continuación se presentan las características sobresalientes de este vector y su correspondiente mapa:

- vector shuttle capaz de replicarse tanto en levaduras como en *E.coli*.
- plásmido multicopia: basado en el plásmido de levaduras 2 μ que está presente de 30/50 copias por célula.
- marcador de selección en *E.coli*: resistencia a ampicilina
- marcador desección en levaduras: gen *URA3*

Mapa



T3 — Sac1 Sac2 Not1 Xba1 Spe1 BamH1 EcoR1 EcoRV Hind3 Cla1 Xho1 — T7

Mapa de la construcción pW3:

Luego de cortar *pW3* y *pRS426* con *BamH1* y *Sac1* se sembraron las muestras en un gel de agarosa 1% preparativo y los fragmentos de interés fueron eluidos por el método del GeneClean, según se describe en M & M. Se calculó la concentración de ambos mediante un gel analítico y se procedió a la reacción de ligación:

- 5 ng *pW3* (*BamH1*-*Sac1*)
- 5 ng *pRS426* (*BamH1*-*Sac1*)
- T4 DNA ligasa
- volumen final de incubación : 10 µl; incubación O.N. a 16°C.

E.coli XL1-Blue fue transformada con la mezcla de ligación; se hicieron minipreparaciones plasmídicas de 4 colonias resistentes a ampicilina y se analizó el patrón de restricción para la enzima *Cla1* y para la doble digestión *BamH1*-*Sac1* (Figura 50)

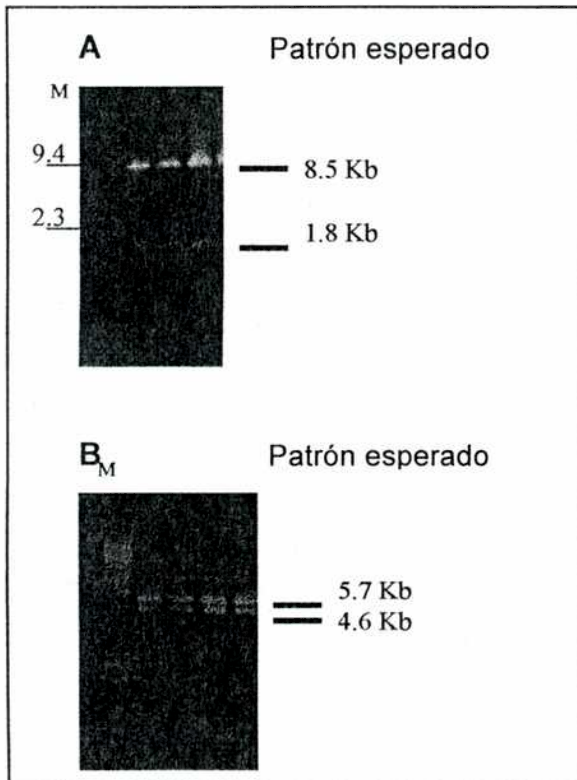


Figura 50- Gel agarosa 1% teñido con BrEt. M = Marcadores PM λ Hind III (23 Kb, 9.4 Kb, 6.6 Kb, 2.3 Kb, 2 Kb),

A-muestras proveniente de colonias resistentes a ampicilina cortadas con *ClaI*

B- mismas muestras que en A cortadas con *BamH1*-*SacI*

El patrón encontrado para las distintas muestras de DNA coincidió con el esperado para *pRS426* conteniendo el inserto deseado de 4.6 kb.

Construcción de cepas *bcy1 Δpep4*

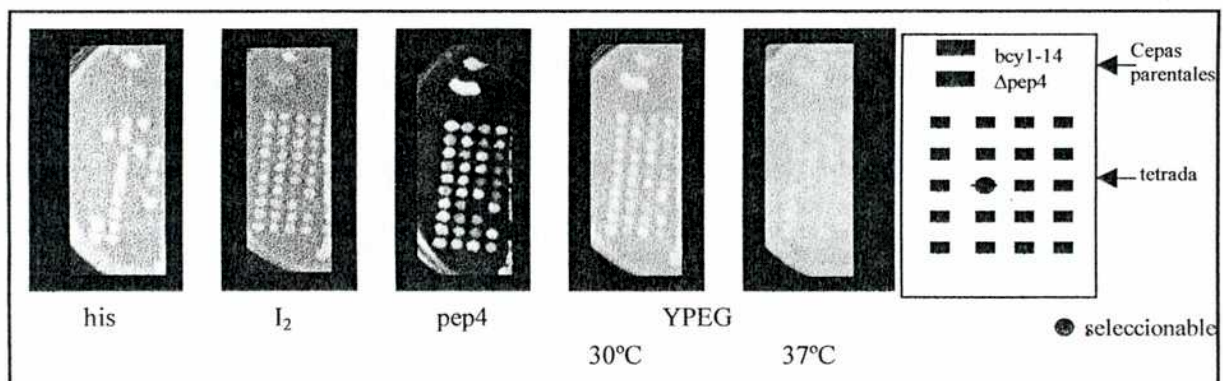
Se desarrollaron cepas *bcy1 Δpep4*. *PEP4* es un gen estructural que codifica para el precursor PrA. Esta proteína es esencial para la correcta maduración de varias hidrolasa vacuolares, por lo cual la purificación de una proteína expresada en un fondo genético *Δpep4*, se ve facilitada.

Se cruzaron cada una de las cepas *mat α leu2 ura3 bcy1 RAS2* con la cepa *mat a his3 Δpep4* y se seleccionaron cepas *leu2 ura3 his3 Δpep4 bcy1 RAS2*. Se pusieron a crecer en un medio pobre que favorece la esporulación y luego se realizó la disección de ascos y análisis de tetradas.

Se utilizaron los siguientes fenotipos para determinar la presencia de los siguientes alelos:

- *bcy1* niveles de glucógeno (mediante tinción con I_2), crecimiento en YPEG a 37°C y viabilidad a través del crecimiento en una placa con phloxina (colorante vital)
- *Δpep4* ensayo de actividad de carboxipeptidasa Y (CpY) usando como sustrato: N-acetyl-DL-phenylalanina β- naphthyl ester (APE). Aquellas colonias que son CpY⁺ (*PEP4*) se tiñen de color rojo, mientras que las CpY⁻ (*Δpep4*) lo hacen de amarillo. Es de notar que en el caso de las cepas *bcy Δpep4* la tonalidad es rosada.
- auxotrofías por falta de crecimiento en un medio carente de histidina uracilo o leucina.
- *mat a ó α* ensayo basado en la habilidad de una cepa indicadora de crecer en un medio mínimo después de complementar sus auxotrofías gracias al apareamiento.

A continuación, y a modo de ilustración, se presentan los resultados observados durante el análisis de tetradas del cruzamiento de la cepa *mat α leu2 ura3 bcy1-14 RAS2* con la cepa *mat a his3 Δpep4*



- Adams, J.A. & Taylor, S.S (1993), *J. Biol. Chem.* 268, 7747 - 7752.
- Alhanaty, E. & Shaltiel, S., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 8, 323 - 332.
- Angelo R & Rubin CS (1998) *J Biol Chem*;273,14633-14643
- Beavo, J.A.; Betchel, P.J. & Krebs, E.G. , (1974), *Proc. Natd. Acad. Sci. USA.* 7,1 3580 - 3583.
- Beebe, S.; Øyen, O.; Sandberg, M.; Frøysa, A.; Hansson, V. & Jahnsen, T., (1990), *Mol. Endocrinol.* 4, 465 - 475.
- Beebe, S. & Corbin, J.D. The Enzymes: Control by phosphorylation, part A vol: 77; eds. New York, Academic, 1986, 43 - 111.
- Botsford, J.L., (1981), *Microbiol. Rev.* 45, 620-642.
- Bradford, M. (1976), *Anal. Biochem.* 72, 248- 254.
- Broach, J.R. & Deschenes, R.J. (1990) *Adv. Cancer Res* 54, 79-139
- Bubis, J. & Taylor, S.S. (1987) *Biochemistry* 26, 5997-6004
- Bubis, J.; Saraswat, L.D. & Taylor, S.S.(1988) *Biochemistry* 27, 1570-6
- Buechler, J.A. & Taylor, S.S., (1988), *Biochemistry* 27, 7356 - 7361.
- Buechler, J.A. & Taylor, S.S., (1990), *Biochemistry* 29, 1937 - 1943.
- Buechler, J.A; Vedvick, T.A. & Taylor, S.S., (1989), *Biochemistry* 28, 3018 - 3024.
- Buechler, Y.J.; Herberg, F.W. & Taylor, S.S., (1993), *J. Biol. Chem.* 268, 16495 - 16503.
- Cameron, S., Levin, L., Zoller, M. & Wigler, M. (1988) *Cell* 53, 555-66
- Carr, D.W.; Stofko-Hahn, R.E., Fraser, I.D.C., Bishop, S.M.; Acott, T.S., Brennan, R.G & Scott, J.D. (1991), *J. Biol. Chem.* 266, 14188 - 14192.
- Clegg, C.H., Cadd, G.G. & McKnight, G.S., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3703-3707.
- Clegg, C.H., Correll, L. A.; Cadd, G.G. & McKnight, G.S., (1987), *J. Biol. Chem.* 262, 13111-13119
- Colombo, S., Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., de Winde, J.H., Gorwa, M.F., Colavizza, D. & Thevelein, J.M. (1998), *EMBO J.* 17, 3326-3341.
- Connelly, P. A., Hastings, T.G. & Reimann, E. M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 2325-2330
- Corbin, J.D., Keely, S.L & Park, C.R., (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 218 - 225.
- Corbin, J.D.; Sugden, P.H.; West, L.; Fockhard, D.A.; Lincoln, T.M. & McCarthy, D., (1978), *J. Biol. Chem.* 253, 3997 - 4003.
- Correll, L.A.; Woodford, T.A.; Corbin, J. D.; Mellon, P.L. & McKnight, G.S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 16672-16678.
- Cox, S. & Taylor, S.S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 22614-22622.
- Cho-Chung, Y. S. & Clair, T. (1993) *Pharmac. Ther.* 60, 265-288.

- Dekker, L. V. & Parker, P. J. (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19, 73-77
- Denis, C.L., Kemp, B.E. & Zoller, M.J. (1991) *J Biol Chem* 266, 17932-17935
- De Vendittis, E., Vitelli, A., Zahn, R. & Fasano, O. (1986) *EMBO J* 5, 3657- 3663
- Donella-Deana, A., Lovoinne, A., Marin, O., Pirna, L. A. & Cohen P. (1993) *Biochim Biophys. Acta* 1178, 189-193.
- Døskeland, S. O., Maronde, E. & Gjersten, B. T. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1178, 249-258.
- Døskeland, S.O. & Øgreid, D.(1984), *J. Biol. Chem.* 259, 2291 - 3201.
- Ekanger, R.; Vintermyr, O.K.; Houge, G.; Sand, T.E.; Scott, J.D.; Krebs, E.G.; Eikitor, T.; Christoffersen, T.; Øgreid, D. & Døskeland, S.O., (1990), *Mol. Endocrinol.* 4, 481-488.
- Engelberg, D., Klein, C., Martinetto, H., Struhl, K., & Karin, M. (1994) *Cell* 77, 381-390.
- Fantozzi, D.; Harootunian, A.; Wen, W.; Taylor S.S.; Feramisco, J.; Tsien, R. & Mein Kothy, J., (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 2676 - 2686.
- Fischer, E.H. & Krebs, E.G., (1955), *J. Biol. Chem* 216, 121-132.
- Francis, S. H. & Corbin, J. D. (1994) *Annu. Rev. Physiol.* 56, 237-272.
- Gibbs, JB & Marshall, MS (1989) *Microbiol Rev* 53, 171-85
- Gibson, R.M., & Taylor, S.S. (1997) *J.Biol.Chem.* 272, 31998-32005.
- Gibson, R.M., Ji-Buechler, Y. & Taylor, S.S. (1997) *J.Biol.Chem* 272, 16343-16350
- Glass, D.B., Feller, M.J., Levin, L.R. & Walsh, D.A. (1992), *Biochemistry* 31, 1728-1734.
- Gorner, M., Schuller, C. & Ruis, H. (1999) *J Exp Med* 380, 147-150
- Granot, J.; Mildvan, A.S. & Kaiser, E.T. (1980), *Arch. Biochem. Biophys*, 205, 1 - 17.
- Granot, J.; Mildvan, A.S.; Hiyama, K. Kando, H. & Kaiser, E.T, (1980), *J. Biol. Chem.* 225, 4569 - 4573.
- Gross, R.E. & Rubin, C.S., (1990), *J. Biol. Chem.* 260, 6296-
- Guthmann, M.; Pastori, R. & Moreno, S., (1990), *Cellular Signalling* 2, 395 - 402.
- Haidle, C.W. & Storck, R., (1966), *J. Bacteriol.* 92, 1236 - 1244.
- Hanks, S.K.; Quinn, A.M. & Hunter, T., (1988), *Science* 241, 42 - 52.
- Hedin, L., McKnight, G.S., Lifka, J., Durica, J.O. & Richards, J.S. (1989), *Endocrinology* 120, 1928-1935.
- Hemmings, B.A., Aitken, A., Cohen, P, Rymond, M. & Hofmann, F. (1982), *Eur. J. Biochem.* 127, 473-481.
- Herberg, F.; Dostmann, W.; Zorn, M.; Davis, S. & Taylor, S. (1994), *Biochemistry* 33, 7485 - 7494.
- Herberg, F.; Taylor, S. & Dostmann (1996), *Biochemistry* 35, 2934-2942
- Hoffmann, F.; Beavo, J.A.; Betchel, P. & Krebs, E.G., (1975), 250, 7795 - 7801.

- Houge, G.; Vintermyr, O.K. & Døskeland, S.O., (1990), *Mol. Endocrinol.* 4, 481 - 488.
- Huang L.J. & Taylor SS (1998) *J Biol Chem* 273, 26739-46
- Huang, L.J.. & Taylor, S.S. (1998)
- Humble, E.; Berglund, L.; Titariji, V.; Ljungström, O.; Edlund, B.; Zetterqvist, Ö. & Engström, L., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 614 -
- Hunter, T. & Plowman, G. D. (1997) *Trends Biochem Sci* 22, 18-22
- Jackiw, V. & Hunzicker-Dunn, D., (1992), *J. Biol. Chem.* 267, 14335 - 14344.
- Jahnsen, T.; Hedin, L.; Kidd, V.J.; Beattie, W.G. & Lohmann, S.M. (1986), *J. Biol. Chem.* 261, 12352 - 12361.
- Jiang, Y., Davis, C., & Broach, J. R. (1998) *Embo Journal* 17, 6942-6951
- Johnson, K. E., Cameron, S., Toda, T., Wigler, M. & Zoller, M. J. (1987) *J Biol Chem* 262, 8636-42
- Johnson, D.A., Leathers, V.L., Martínez, A.M., Walsh, D.A. & Fletcher, W.H. (1993) *Biochem.* 32, 6402-6410.
- Kemp, B.E., Benjamini, E. & Krebs, E.G. (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 1038-1042.
- Kemp, B.E.; Bylund, D.B.; Huang, T.S. & Krebs, E.G., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72, 3448
- Kemp, B.E.; Graves, D.J., Benjamini, E. & Krebs, E.G., (1977), *J. Biol. Chem.* 252, 4888
- Kennelly, P.J. & Krebs, E.G. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 15555-15558.
- Kerner, N. & Passeron, S. (1984), *Mol. Cell. Biochem.* 60, 115-122.
- Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., Xoung, N., Taylor, S.S. & Sowadski, J.M. (1991), *Science* 253, 407-414.
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P. S., Teunissen, A. W. R. H., Donaton, M. C. V., VanDijck, P., Winderickx, J., deWinde, J. H. & Thevelein, J. M. (1999) *Mol Microbiol* 32, 1002-1012
- Krebs, E.G. & Beavo, J.A. (1979), *Annu. Rev. Biochem.* 48, 923-959.
- Kubler, E., Mosch, H. U., Rupp, S. & Lisanti, M. P. (1997) *J Biol Chem* 272, 20321-20323
- Kuret, J., Johnson, K., Nicolette, C. & Zoller, M.J. (1988), *J. Biol. Chem.* 263, 9149-9154.
- Laemmli, U.K., (1970), *Nature, Lond.* 227, 680 - 685.
- Lanagan, T.A. (1973), *Adv. Cyc. Nucl. Res.* 3, 99.
- Landmark, B.F., Fauske, B., Esklid, W., Skålhegg, B., Lohmann, S.M., Hansson, V., Jahnsen, T. & Beebe, S.J. (1991), *Endocrinology* 129, 2345-2354.

- Lee, D.C., Carmichael, D.F., Krebs, E.G. & McKnight, G.S., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3608-3612.
- Levin, L.R. & Zoller, M.J. (1990), *Molec. Cell. Biol.* 10, 1065 -1075.
- Levin, L.R.; Kuret, J.; Johnson, K.E.; Power, S.S.; Cameron, S.; Michaeli, T.; Wigler, M. & Zoller, M.J., (1988), *Science* 240, 68 - 70.
- Ma, P., Wera, S., Van Dijck, P. & Thevelein, J M (1999) *J. M. Mol Biol Cell* 10, 91-104.
- Maggese, M.C., Galvagno, M.A., Cantore, M.L. & Passeron, S. (1982), *Cell. Biol. Intl. Rep.* 6, 1101-1108.
- Matsumoto, K.; Uno, I. & Ishikawa, T. (1985) *Yeast* 1,15-24
- Matsumoto, K.; Uno, I.; Oshima, Y. & Ishikawa, T. (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* 79 2355-9
- McKnight GS.(1991) *Curr Opin Cell Biol.* 3, 213-7.
- Moreno, S., Pastori, R. & Passeron, S. (1983) *Mol. Cell. Biochem.* 52, 13-16.
- Moreno, S. & Passeron, S. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* 199, 321-330.
- Mosbashery, S. & Kaiser, E.T. (1988), *Biochemistry* 27, 3691-3696.
- Mumby, M.C., Weldon, S.L., Scott, C.W. & Taylor, S.S., (1985), *Pharmacol. Ther.* 28, 367-387.
- Munder, T. & Kuntzel, H. (1989) *FEBS Lett* 242, 341-345.
- Mutzel, R., Lacombe, M., Simon, M.N., de Gunzburg, J. & Veron, M., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6-10.
- Nakafuku, M., Obara, T., Kaibuchi, K., Miyajima, I., Miyajima, A., Itoh, H., et al (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 12428-12432
- Nikawa, J., Cameron, S., Toda, T., Ferguson, K.W. & Wigler, M. (1987) *Genes Dev* 1, 931-937
- Ochatt, C.M., Ulloa, R.M., Torres, H.N. & Tellez-Iñón, M.T. (1993) *Mol Biochem Parasitol* 57, 73-81
- Ogreid D & Doskeland SO (1983) *Biochemistry* 22, 1686-96
- Pall, M. (1981), *Microbiol. Rev.* 45, 462-480.
- Pastori, R., Moreno, S. & Passeron, S. (1985), *Mol. Cell. Biochem.* 69, 55-66.
- Pastori, R., Kerner, N., Moreno, S. & Passeron, S. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 663-671.
- Paveto, C., Passeron, S., Corbin, J. D. & Moreno, S. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179, 429-434.
- Pereyra, E., Zaremberg, V. & Moreno, S. (1992) *Exper. Mycol.* 16, 93-101.
- Poteet-Smith, C.E.; Shabb, J.B.; Francis, S.H. & Corbin, J.D. (1997) *J. Biol. Chem* 272, 379-388.

- Potter, R.L.; Sttaford, P.H. & Taylor, S.S., (1978), *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 174 - 180.
- Puri, R.N.; Bhatnagar, D. & Roskoski, R. (1985), *Biochemistry* 24, 6499 - 6508.
- Rangel-Aldao, R. & Rosen, O. (1977), *J. Biol. Chem.* 252, 7140-7145.
- Resnick R.J. & Racker E (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 2474-2478
- Ringheim, G.E. & Taylor, S.S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 19472-19478
- Ringheim, G.E. & Taylor, S.S. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 4800-4808.
- Robison, G.A., Butcher, R.W. & Sutherland, E.W. (1971), En: *Cyclic AMP*. Academic Press. New York.
- Ronne, H. (1995). *TIG* 11, 12-17.
- Rosen, O.M. & Erlichman, J. (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 7788-7794.
- Roskoski, R. (1983), *Methods Enzymol.* 99, 168-175.
- Rossi, S. & Moreno, S. (1994), *Eur. J. Biochem.* 222, 501-506.
- Rossi, S., Guthman, M. & Moreno, S. (1992). *Cell. Signal.* 4, 443-451.
- Rubin, C.S., Rangel-ALdao, R., Sarkar, D., Erlichman, J. & Fleischer, N. (1979), *J. Biol. Chem.* 254, 3797-3805.
- Russel, D.H., (1978), *Adv. Cyc. Nucl. Res.* 4, 311-321.
- Russell, M., Bradshaw-Rouse, J., Markwardt, D., & Heideman, W. (1993) *Mol Biol Cell* 4, 757-765.
- Saraswat, L.D.; Ringheim, G.E.; Bubis, J. & Taylor, S.S. (1988) *J. Biol Chem.* 263 18241-18246
- Saraswat, L.D.; Ringheim, G.E.; Bubis, J.; & Taylor, S.S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 18241-18246.
- Scott, J.B., Glaccum, M.B., Zoller, M.J., Unhler, M.D. & Helfman, D.M., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5192-5197.
- Scott, J.D. (1991), *Pharmacol. Ther.* 50, 123-145.
- Scott, J.D. (1997), *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 52, 227-239.
- Scott, J.D. & McCartney, S. (1994), *Mol. Endocrinol.* 8, 5-11.
- Scott, J.D.; Stofko, R.E.; McDonald, J.R.; Comer, J.D.; Vitalis, E.A. & Mangilis, J., (1990), *J. Biol. Chem.* 265, 21561 - 21566.
- Shabb, J.B. & Corbin, J.D. (1992), *J. Biol. Chem.* 267, 5723-5726.
- Shoji, S., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Fisher, E.H. & Titani K (1983), *Biochemistry* 22, 3702-3709.
- Showers, M.O. & Mauer, R.A. (1986), *J. Biol. Chem.* 261, 15360-15361.
- Silberstein, S., Cantore, M.L., Galvagno, M.A. & Passeron, S. (1990), *Arch. Biochem. Biophys.* 282, 132-140.
- Skálhegg, B.S. & Taskén, K. (1997), *Frontiers in Bioscience* 2, 331-342.

- Smith, A., Ward, M. P. & Garrett, S. (1998) *Embo Journal* 17, 3556-3564
- Steinberg, R. A. & Agard, D.A. (1981), *J. Biol. Chem.* 256, 10731-10734.
- Steinberg, R., Cauthron, R., Symcox, M. & Shuntoh, H. (1993), *Molec. and Cell. Biol.* 13, 2332-2341.
- Steinberg, R.A.; Symcox, M.M.; Sollid, S. & Øgreid, D. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 27630-27636.
- Su, Y., Dostmann, R.G., Herberg, F.W., Durick, K., Xuong, N-h., Ten Eyck, L., Taylor, S.S. & Varughese, K.I. (1995) *Science* 269, 807-813.
- Sutherland, E.W. & Rall, T.W. (1958), *J. Biol. Chem.* 232, 1077-1091.
- Sutherland, E.W. & Wosilait, W.D. (1955), *Nature* 175, 169-170.
- Takio, K.; Smith, S.B.; Krebs, E.G.; Walsh, K.A. & Titani, K., (1984), *Biochemistry* 23, 4200 - 4206.
- Tanaka K, Nakafuku M, Tamanoi F, Kaziro Y, Matsumoto K, Toh-E A (1990) *Mol Cell Biol* 10, 4303-13
- Tanaka, K., Matsumoto, K. & Toh-EA. (1989) *Mol Cell Biol* 9, 757-68
- Taskén, K., Skálhegg, B. S., Taskén, K. A., Solberg, R., Knutsen, H. K., Levy, F. O., Sandberg, M., Ørstavik, S., Larsen, T., Johansen, A. K., Vang, T., Schrader, H. P., Reinton, N.T.K., Torgersen, K. M., Hansson, V. & Jahnsen, T. (1997) *Adv. Second Phosphoprotein Res.* 31, 191-204
- Taskén, K.A., Knutsen, H.K., Attramadal, H., Taskén, K; Jahnsen, T.; Hansson, V. & Esklid, W. (1991), *Molec. Endocrinol.* 5, 21-28.
- Tatchell K, Robinson LC & Breitenbach M (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3785-9
- Tatchell, K. (1993) *En Signal Transduction Prokaryotic and Simple Eukaryotic Systems. San Diego: Academic Press*, 147-188
- Taylor, S.S. & Radzio-Andzelm, E. (1994), *En: Protein Kinases*. J. Woodgett. IRL Press, Oxford University press. New York.
- Taylor, S.S.; Buechler, J.A. & Knighton, D., (1990), *Peptides and Phosphorylation*, Kemp, B. E., *Crit. Rev. Biochem.* 1 - 41.
- Terenzi, H.F., Rosellino, E. & Passeron, S. (1971), *Eur. J. Biochem.* 18, 342.
- Thevelein J. M. (1994). *YEAST* 10, 1753-1790.
- Thevelein, J. (1988), *Exp. Mycol.* 12, 1 - 12.
- Thevelein, J.M. & Hohmann, S. (1995) *TIBS* 20, 3-10.
- Thevelein, J.M. & Winde, J.H. (1999) *Mol. Microbiol.* 33, 904-918
- Thevelein, J.M. (1991) *Mol. Microbiol* 5, 1301-1307.
- Thompson, W.J., Ross, C., Pledger, W.J., Strada, S., Banner, R. & Hersh, E. (1976). *J. Biol. Chem.* 251, 4922-4929.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. & Wigler, M. (1987) *Cell* 50, 277-287.

- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. Scott, J.D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs & E.G. Wigler, M. (1987), *Mol. Cell. Biol.* 7, 1371-1377.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D *et al.* (1985) *Cell* 40, 27-36
- Toner-Webb, J.; Van Patten, S.; Walsh, D. & Taylor, S.S., (1992), *J. Biol. Chem.* 267, 25174 - 25180.
- Walsh, D. & Patten, S. (1994) *FASEB J.* 8, 1227-1236.
- Walsh, D.A., Ashby, C.D., Gonzalez, C., Calkins, D., Fisher, E.H. & Krebs, E.G. (1971), *J. Biol. Chem.* 246, 1977-1985.
- Walsh, D.A.; Perkins, J.P. & Krebs, E.G., (1968), *J. Biol. Chem.* 243, 3763 - 3765.
- Wang, Y., Scott, J.D., McKnight, G.S. & Krebs, E.G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2446-2450.
- Ward, M.P., Gimeno, C.J., Fink, G.R. & Garret, S. (1995) *Mol Cell Biol* 15, 6854-6863
- Weber, I.T.; Takio, K.; Titani, K. & Steitz, T.A., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79, 7679-7683.
- Wigler, M., Field, J., Powers, S., Broek, D., Toda, T., Cameron, S. *et al* (1988) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 53, 649-655.
- Woodford, T.A.; Correll, L.A.; McKnight, G.S. & Corbin, J. D. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 13321-13328
- Worthington Enzyme Manual (1972), Worthington Biochemical Corp., Freenold, New Jersey.
- Xue, Y., Batlle, M & Hirsch, J. P. (1998) *Embo Journal* 17, 1996-2007
- Yang S., Fletcher, W. H. & Johnson, D. A. (1995) *Biochemistry* 34, 6267-6271.
- Zelada, A., Passeroni, S., Lopes Gomes, S. & Cantore, M.L. (1998) *Eur. J. Biochem.* 252, 245-252
- Zhao, J., Hoyer, E., Boylan, S., Walsh, D.A. & Trewhella, J. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 30448-30459
- Zick, S. & Taylor, S.S. (1982), *J. Biol. Chem.* 257, 2287-2293.
- Zoller, M.J. & Taylor, S.S. (1979), *J. Biol. Chem.* 254, 8363-8368.

Se presenta a continuación un resumen de las observaciones de estudios de mutagénesis y cristalización, que llevaron a postular a los aminoácidos indicados en cada caso como importantes, ya sea para la dimerización, la interacción con C, con el cAMP o para la cooperatividad entre sitios.

MUTACIONES RI	observaciones	cita															
G200/E sitio A G324/D sitio B R332/H sitio B	<i>in vivo</i> Mutaciones identificadas en variantes celulares de la línea S49 de linfoma murino, resistentes a cAMP. Estas mutaciones inhiben la disociación de la holoenzima por cAMP. El grado de inhibición fue dependiente de la cantidad de RI mutada expresada, donde la holoenzima requería 20-400 veces más cAMP para su activación.	Clegg <i>et al</i> , 1987.															
G324/D sitio B (1) R332/H sitio B (2)	Disociación cAMP B1 bifásica B2 monofásica Activación B1 cooperatividad + cte. activación wt=40 nM B1=188nM B2 sin cooperatividad cte. activación B2>4.7 µM	Correll <i>et al</i> , 1989.															
G200/E sitio A (A) G324/D sitio B (B) R332/H sitio B (B) doble mutante (AB) del 267-380 sin sitio B (del B) equiv. <i>bcy1-16</i>	<i>in vitro</i> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th><th>une cAMP</th><th>unión con C</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td><td>+</td><td>estable</td></tr> <tr> <td>B</td><td>+</td><td>estable</td></tr> <tr> <td>AB</td><td>-</td><td>inhibe, pero es muy inestable</td></tr> <tr> <td>del B</td><td>+</td><td>se asocia con C inhibe con baja eficiencia.</td></tr> </tbody> </table>		une cAMP	unión con C	A	+	estable	B	+	estable	AB	-	inhibe, pero es muy inestable	del B	+	se asocia con C inhibe con baja eficiencia.	Woodford <i>et al</i> , 1989
	une cAMP	unión con C															
A	+	estable															
B	+	estable															
AB	-	inhibe, pero es muy inestable															
del B	+	se asocia con C inhibe con baja eficiencia.															
W260/stop sin sitio B equiv. <i>bcy1-16</i>	-une cAMP -une sub. C -holo disociable secuencia mínima funcional: Arg 94 a Lys 259	Saraswat <i>et al</i> , 1988.															

MUTACIONES RI	observaciones	cita
del 1-91	-formación holo acelerada aprox. 50 veces -pérdida de cooperatividad -Kd y Ka (cAMP) similar a la wt -puede migrar libremente al núcleo mientras que wt no -a diferencia de PKI, la región que precede al sitio de autoinhibición no contribuye cuantitativamente a la unión de alta afinidad a C.	Herberg <i>et al</i> , 1994.
R209/K sitio A (A) R333/K sitio B (B) Doble mutante (AB)	R209/K -reducción del radio de Stokes -ocupancia del sitio B no es suficiente para activar la holo, el sitio A de baja afinidad también debe ser ocupado R333/K -sitio A retiene su alta afinidad pero no puede ser ocupado hasta que no se ocupa el B -de esta manera ambas mutantes, por diferentes razones, presentan Ka_s 20 veces superiores a la Rwt -AB, comportamiento similar a las mutantes simples -en presencia de Mg/ATP, ambas mutantes rápidamente forman una holo muy estable, aún en presencia de cAMP, en contraste con la Rwt que se forma lentamente y requiere diálisis. Conclusiones: • sitio A es el de mayor contacto con C • sitio B no es esencial para la formación de la holo • ocupancia del sitio por cAMP media la disociación de la holo • sitio A es totalmente inaccesible al cAMP mientras que el sitio B no • el acceso del cAMP al sitio A es mediado por el sitio B • de esta manera el sitio B no solo protege al A sino que provee la señal para "abrir" el sitio A • un sitio A no funcional en la holo previene la unión estable del cAMP al sitio B en ausencia de disociación	Herberg <i>et al</i> , 1996.

MUTACIONES RI	observaciones	cita
R210 x 9 sustituciones diferentes	-Todas las sustituciones reducen la afinidad de unión del cAMP al sitio A, pero la magnitud de la variación va de 100 a 10⁶ veces. -los grupos guanidino de Arg-210 son importantes para la alta afinidad por cAMP, pero no juegan ningún rol en las respuestas alostéricas provocadas por la unión del cAMP al sitio A. Esto es no afecta el acople con el sitio B y tampoco en el efecto alostérico por el cual la ocupancia del sitio A disminuye la afinidad de R por C.	Steinberg <i>et al</i> , 1996
Región pseudosustrato Arg ⁹² -Arg-Arg-Arg-Gly- <u>Ala</u> -Ile-Ser-Ala-Glu	-Δ1-92 ó 1-93 no tuvieron efectos detectables en cuanto a la inhibición de C. -Δ1-94 o mutación puntual de Arg⁹⁵ en las mutantes truncadas Δ1-92/ Δ1-93 causaron una importante disminución en la potencia inhibitoria de la R. -Δ1-95 efecto mayor que el reemplazo o sustitución de Arg⁹⁴ o Arg⁹⁵. -Ile⁹⁸/ Ala-Gly ó Gln redujo la potencia inhibitoria de la R mientras que no se alteró si el reemplazo se hacía con Val. -no se observaron cambios cuando Glu¹⁰¹ fue sustituido por Ala o Gln. -Conclusión: Arg⁹⁴, Arg⁹⁵ y en menor medida Ile⁹⁸, constituyen elementos vitales para la autoinhibición de la PKA de tipo Iα por su subunidad R.	Poteet-Smith <i>et al</i> , 1997.

MUTACIONES RI	observaciones	cita
E105A/E106A/D107A E105A E106A E107A D140A E143A E255A D258A	Sitios protegidos de modificación química en RI: ⇒ -afecta interacción R/C ⇒ -afecta suavemente ⇒ -no afecta ⇒ -no afecta ⇒ -afecta ⇒ -afecta ⇒ -no afecta ⇒ -afecta	Gibson <i>et al.</i> , 1997.
E101A	⇒ -Residuo conservado. -Mutación equivalente en R de levadura, BCY1, desorganiza la interacción R/C. -No protegido por modificación química en RI. -no afecta la interacción R/C	
D170A	⇒ Residuo ácido conservado en sitio A, que hace pte H con R209. -actúa como una R desnuda de cAMP en experimentos de inhibición de C, dando una inhibición lineal sin tratamiento previo con urea, pero no varía la afinidad de R/C. No dan una explicación acabada del porqué. -no varía la afinidad por cAMP -no varía la Ka aparente de activación de la holoenzima por cAMP -aumento de las tasas de asociación y disociación de cAMP.	
K242A	⇒ Residuo básico expuesto en la hélice C del sitio A. ⇒ -comportamiento similar a D170A.	

MUTACIONES RII	observaciones	cita
del 1-94 (extremo NH ₂)	Cambia el patrón de marcado por 8-azido cAMP: wt no se marca en ningún aa en sitio A del 1-94----->dom A= Y196+Y381	Bubis & Taylor, 1987
RR92,93/AA	-RII mutada en su forma libre de cAMP es capaz de formar una holo estable -esta holo se disocia en presencia de cAMP -esta holo retiene su actividad "total" en ausencia de cAMP -a pesar de no poder ser fosforilada por la subunidad C la tasa de liberación de cAMP aumenta con el agregado de C -R92 y 93 no son esenciales para la formación de la holo pero si para la inhibición de su actividad -debe existir otra zona de interacción con C en RII, a parte de la "bisagra", que interactúe de manera cAMP dependiente	Wang <i>et al</i> , 1991
E99A	mutación equivalente a E150A de la BCY1, que lleva a un reconocimiento defectivo de la C (TPK1) -cuando wtRII inhibió 95% la actividad de C RII(E99A) solo inhibió el 20%. -por lo tanto es un residuo importante en la interacción R/C. Es de notar que la mutación del Glu equivalente en RI no afecta esta interacción.	Gibson <i>et al</i> , 1997.

C-ALPHA	1	-----
C-BETA	1	-----
C-GAMMA	1	-----
Drosophila	1	-----
C.elegans	1	-----
C-APL-B	1	-----
Plasmodium	1	-----
P.	1	-----
DC2	101	PDPAATKSRSSSTATTITSSADHDNDVDE--
A.suum	1	-----
Leishmania	1	-----
Dictyostelium	181	TTTTTTTTTTNPTSGLSLQHAHSSYTPSNVLHSPTHFQSSLPTRLDTNPITTPIR----
Ustilago	1	-----
TPK1	4	EEQNGGGQKSLDDRQ--EESQKGE-----T SERE-----TTATESGNESEKS----
TPK3	4	DFMNNNEIRKLSITAK--TETTPDN-----VGQDI-----PVNAHNVHEECSSN----
TPK2	1	-----MEFVAE--RAQPVGQ-----TIQQQ-----NVNTYGGQVLPQ----
Colletotrichum	99	PQQNLPSISNLINPTQHDASSN-GHNYLAHATQTSQPN-----PSPGTDPTRLQQQQQAQSMH
Magnaporthe	104	PQQSLPSISNLHNPVQQQNSQPSANFQPSQSQSQSQSQFPLPSSHGNGDQSQQQNFQV
Aspergillus	75	PQDSVPPQSSNRSSGAE--KSSD-GQ--VA-SMQSAVTO-----ASPSAHHTSGLPQ----
Fission	96	PDSLVSSTSGCASAHVGYQNIIDNLIPSPLPESASRS--SSQSSHQRHSRDGRG----
Blastocladiella	18	SDKDAPAPASPSPSSTAAGAGCASSTASSTTTAAASGNLSIPSPLVAGSTTSSS----
DC1A	1	-----
KINASE	1	-----
consensus	181	

C-ALPHA	1	-----MGNAAAAKKGSEQSVKFLAKAKEDFLKKWE-----SPAQNT
C-BETA	1	-----MGNAATAKKGSEVSVKFLAKAKEDFLKKWE-----NPTQNN
C-GAMMA	1	-----MGNAPAKKDTQEESVNEFLAKARGDFLYRWG-----NPAQNT
Drosophila	1	-----MGNNATTISNKKVDAATVKEFLEQAKKEEFEDKWR-----RNPNTT
C.elegans	1	-----MLKFLKPKSSDEGSSKDNKNSASLKEFLDKAREDFKQWE-----NPAQNT
C-APL-B	1	-----MAHNQVFPESQKWLKYLESSLEQFENLFN-----KNVIST
Plasmodium	1	-----MQFKNLQLNKKKSDSSSEQVLTN-----KKNK
P.	1	-----MQFKNLQLNKKR--ETSDIKPNT-----KSKK
DC2	154	ESIEEDDGHETDDDDDESSSSVQTTA-----KQVRK
A.suum	1	-----MENREQ--IEPCVSITID-----PNNNK
Leishmania	1	-----MITR-----AEASQ
Dictyostelium	237	-----QQQSQQLQQQQLQIPPTVNSFFLPP-----PVNAR
Ustilago	12	-----AASSDPKTSSTSKVARSVGSASPLRS-----SPNRP
TPK1	44	-----VEKEGGTQEKPKOPHYTYNNEEQYKQFIA-----QARVTSKG
TPK3	46	-----TPVEING--RNSG-KLKEASAGICLVKKPML-----QYRDTSGK
TPK2	31	-----HHDLQQ--RQQ--QQQRHQQLLTSLPQ-----KSLVSKGK
Colletotrichum	155	HPPTQFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQTQTQPTAKERHAATGAG-PAGRQTKGK
Magnaporthe	164	QQQIQSQDAMDIPPSQVQDSHSSQQAQPHQPHHVVQHNVN-HAHQGSQDQTRVTGK
Aspergillus	120	-PNANAASIQNIINPSQ-QGAMHSASSG--HTQSHHAGRS--ARTTKGK
Fission	149	-----ELGSEHGERRSAMDGLRDRHIRKVRVSQLLDLQRR--IRPADHTTKDR
Blastocladiella	72	-----ISHAQKMTAAHTNSDYSPSPAATPSAPLDAVAE-----RRRRK
DC1A	1	-----MSQHTSQVFNKSDYHVLNDHMSREFEERWN-----HQTQSPY
KINASE	1	-----
consensus	241	LFHKAKFECHKNLISIVHYVAFK-----VLTWKR

C-ALPHA	39	AHLDQFERIKTLGTGSGFRVMLVKHK-----ETGNHYAMKILDKOKVVKLKQIEHTLNEK
C-BETA	39	AGLEDFERKKTLGTGSGFRVMLVKHK-----ATEQYAMKILDKOKVVKLKQIEHTLNEK
C-GAMMA	39	ASSDQFERLTLGTGSGFRVMLVRHQ-----ETGGHYAMKILDKOKVVKLKQIEHTLNEK
Drosophila	41	AALDDFERIKTLGTGSGFRVMLVQHK-----PTKDYAMKILDKOKVVKLKQIEHTLNEK
C.elegans	47	ACLDDEIRIKTLGTGSGFRVMLVKHK-----QSGNYAMKILDKOKVVKLKQIEHTLNEK
C-APL-B	37	ESIRNYTLIRTLGTGSGFRVMLSQHG--DNPKKCAIKILDKOKVVKLKQIEHTLNEK
Plasmodium	29	MKYEDENFIRTLGTGSGFRVILATYK-----NGNYPPVAIKRFEKCKIIRQKQVNVFESR
P.	28	MKYEDENFIRTLGTGSGFRVILATYK-----NEDLPPVAIKRFEKCKIIRQKQVNVFESR
DC2	188	YHDDIGIIRTLGTGSGFRVILQDR-----ISEKYCAMKILAMTEVIRLKOIEHTVKNR
A.suum	24	LNVDDEIRLTLGTGSGFRVILVHR-----ASEQYAMKILAMTEVIRLKOIEHTVKNR
Leishmania	10	WRVSDLEMRDLGTGSGFRVILVHK-----CTGGYAMKILDKOKVILRNKQVNVHMA
Dictyostelium	271	ERLKEFKQIRTLGTGSGFRVILIQN-----TKDGCYAMKILDKOKVYVQLKQVHLS
Ustilago	46	YALSDESVVRLTLGTGSGFRVILVRLORDVADRSAYAMKVLAKTDVILKQVHLS
TPK1	82	YSLQDEQILRTLGTGSGFRVILYRSR-----HNGRYAMKVLKKEIIVDLKQVHTNDR
TPK3	83	YSLQDEQILRTLGTGSGFRVILYRSN-----HNGRYAMKVLKKEIIVDLKQVHTNDR
TPK2	65	YTLHDEQIMRTLGTGSGFRVILVRSV-----HNGRYAMKVLKKEIIVDLKQVHTNDR
Colletotrichum	214	YTLQDEQILRTLGTGSGFRVILVQS-----HNQRFYAMKVLKKAQVVMKQVHTNDR
Magnaporthe	223	YSLTDEQILRTLGTGSGFRVILVQSR-----HNQRFYAMKVLKKAQVVMKQVHTNDR
Aspergillus	164	YSLQDESLQRTLGTGSGFRVILVQSK-----HNHRYAMKVLKKAQVVMKQVHTNDR
Fission	196	YGIQDEHFLQTLGTGSGFRVILVQSN-----HNRLYAMKVLKKEIIVDMKQVHTNDR
Blastocladiella	111	TTIADLRLQRTLGTGSGFRVILVRL-----STGRYAMKVLKKAQVVMKQVHTNDR
DC1A	40	TNENYITRAVLGHQSTQTLVURE-----SGKNYAMKMMSNEDLVRLKQVHVNDR
KINASE	31	TKISDHFYGSLSGSEGTAKLRHR-----GSLFECSTARRRETILHEHKKHVNDR
consensus	301	

C-ALPHA_ 94 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
C-BETA_ 94 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
C-GAMMA_ 94 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
Drosophila 96 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
C. elegans 102 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
C-APL-B 94 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
Plasmodium 85 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
P. 84 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
DC2 243 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
A. suum 79 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
Leishmania 65 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
Dictyostelium 326 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
Ustilago 106 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
TPK1 137 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
TPK3 138 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
TPK2 120 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
Colletotrichum 269 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
Magnaporthe 278 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
Aspergillus 219 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
Fission 251 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
Blastocladiella 166 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
DC1A 95 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
KINASE 86 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL
consensus 361 RILQAVNF PFLV KLEFSEK DNS LYVMVEYVP GDMFSH LRRIGRESEPHAREYAAQIVL

C-ALPHA_ 154 TF EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
C-BETA_ 154 TF EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
C-GAMMA_ 154 TF EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
Drosophila 156 AF EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
C. elegans 162 AF EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
C-APL-B 154 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
Plasmodium 145 IF EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
P. 144 IF EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
DC2 303 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
A. suum 139 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
Leishmania 125 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
Dictyostelium 386 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
Ustilago 166 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
TPK1 197 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
TPK3 198 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
TPK2 180 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
Colletotrichum 329 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
Magnaporthe 338 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
Aspergillus 279 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
Fission 311 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
Blastocladiella 226 AF EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
DC1A 155 AL EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
KINASE 146 AI EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I
consensus 421 TF EYLHSL DLIY RDLKPENLLD QGV I O V T D F G F A K R V K -- G R T W T L C G T P E Y L A P E I I

Sito catalitico

C-ALPHA_ 212 LS -KGYNKAVDWWALGVLIYEMAGYPPFEAD--QP I O I Y E K I V S G K V R F P S H S S D L K D
C-BETA_ 212 LS -KGYNKAVDWWALGVLIYEMAGYPPFEAD--QP I O I Y E K I V S G K V R F P S H S S D L K D
C-GAMMA_ 212 LS -KGYNKAVDWWALGVLIYEMAGYPPFEAD--QP I O I Y E K I V S G K V R F P S H S S D L K D
Drosophila 214 LS -KGYNKAVDWWALGVLIYEMAGYPPFEAD--QP I O I Y E K I V S G K V R F P S H S S D L K D
C. elegans 220 LS -KGYNKAVDWWALGVLIYEMAGYPPFEAD--QP I O I Y E K I V S G K V R F P S H S S D L K D
C-APL-B 212 LN -RSLASQTTGGGLIYELNAGFPFEAD--VPLKLYEELIVGRLTFEFSFKFTLRD
Plasmodium 203 LN -VHGKRAVDWHTLCIFIIYELVGVPPFYAN--SPLLIYERILEGIIYERKFLDNMCW
P. 202 LN -ACHGKRAVDWHTLCIFIIYELVGVPPFYAN--SPLLIYERILEGIIYERKFLDNMCW
DC2 361 QS -KGYNKAVDWWALGVLIYEMAGYPPFEAD--QP I O I Y E K I V S G K V R F P S H S S D L K D
A. suum 197 GN -KGNDTAVDWWALGVLIYEMAGYPPFEAD--TLDFIYERILGKLETRSRSDLFARD
Leishmania 183 QS -KGYNKAVDWWALGVLIYEMAGYPPFEAD--SPKLIYERILGKLETRSRSDLFARD
Dictyostelium 444 QS -KGYNKAVDWWALGVLIYEMAGYPPFEAD--SPKLIYERILGKLETRSRSDLFARD
Ustilago 224 QC -SGHGSVDWWSGLIFEMLAGYPPFYD--NPILLYERILAGHLVFEEDPLSRD
TPK1 255 ST -KPYNKSVDWWSGLIFEMLAGYPPFYD--NTMKTIERILNAGLETRSRSDLFARD
TPK3 256 ST -KPYNKSVDWWSGLIFEMLAGYPPFYD--NTMKTIERILNAGLETRSRSDLFARD
TPK2 238 TY -KPYNKSVDWWSGLIFEMLAGYPPFYD--NTMKTIERILNAGLETRSRSDLFARD
Colletotrichum 387 SN -KPYNKSVDWWSGLIFEMLAGYPPFYD--SPKLIYERILGKLETRSRSDLFARD
Magnaporthe 396 SN -KPYNKSVDWWSGLIFEMLAGYPPFYD--SPKLIYERILGKLETRSRSDLFARD
Aspergillus 337 SS -KPYNKSVDWWSGLIFEMLAGYPPFYD--SPKLIYERILGKLETRSRSDLFARD
Fission 370 SL -KPYNKAVDWWSGLIFEMLAGYPPFYD--SPKLIYERILGKLETRSRSDLFARD
Blastocladiella 284 QS -RKYGKRAVDWALGVLIYEMAGYPPFYD--DHVRMYERILGKLETRSRSDLFARD
DC1A 213 QL -REYNKSVDWWSGLIFEMLAGYPPFYD--FAIHNRRDVLNYSKICIDYKMSVETSQLS
KINASE 206 NS -SNHGKFPVDWWSGLIFEMLAGYPPFYD--KESLLNRRADFQLTFQNSYLSDCIKD
consensus 481 LS -KGYNKAVDWWALGVLIYEMAGYPPFEAD--QP I O I Y E K I V S G K V R F P S H S S D L K D

Referencias:

Cα, Cβ y Cy humanas; *Drosophila melanogaster* PKAC; (*Drosophila*); *Caenorhabditis elegans* (C. elegans); *Aplysia californica* (C-APL-B); *Plasmodium falciparum* (Plasmodium); *Plasmodium yoelii* (P.); *Drosophila melanogaster* DC2 (DC2); *Aplysia suum* (A.suum); *Leishmania*; *Dictyostelium discoideum* KAPC (*Dictyostelium*); *Ustilago maydis* (*Ustilago*), *Saccharomyces cerevisiae* (TPK1, TPK2, TPK3); *Colletotrichum trifolii* (*Colletotrichum*); *Magnaporthe grisea* (*Magnaporthe*); *Aspergillus niger* (*Aspergillus*); *Fisión* yeast (Fisión); *Blastocladiella emersonii* (*Blastocladiella*); *Drosophila melanogaster* DC1A (DC1A); *Dictyostelium discoideum* PKD1 (Kinase).

	310	320	330	340	350	360
Ncrassa	GE-IAEGGS	FGELALMYNA	PRAATVVS	AEPOCTLW	ALDRVTFRR	ILMESTFSRRMYESF
Mgrisea	GT-IEAGGS	FGELALMYNA	PRAATVMS	AEPNCVLW	ALDRVTFRR	ILMESTFSRRMYENF
Scerevisiae	-----	GSSFGELALMYNS	PRAATVVATS	-DCLLWAL	DRLTFRKILL	GSSFKKRLMYDDL
SPombe	TT-ISPGEY	FGELALMYNA	PRAASVVS	KTPNNVIY	ALDRTSFRR	IVFENAYRQRLYESL
B emersoni	VTDYSAGGS	FGELALMYNA	PRAATVVATA	-ESVLWAL	DRVTFRR	ILMDHTSRKRRMYEAF
UMaydis	VS-YGPGSS	FGELALLYAQ	PRAATVLSTS	-ACTLWAL	DRITFRS	ILMETNSRRRALLYEF
Celegans	VLTIMEGGS	FGELALIYGT	PRAATVIAKI	-DVKLWAI	DRITYRR	ILMGSVTKKRKMYDEF
RI α	VTNISEGGS	FGELALIYGT	PRAATVKAKT	-DLKLWGI	DRDSYRR	ILMGSTLRKRKMYEEF
RII α	VGQYDNHGS	FGELALMYNT	PRAATIVATS	-EGSLWGL	DRVTFRR	IVKNNAKKRKMFESF
		*****:	* ****:	:	*	:* *:

	370	380	390	400	410	420
Ncrassa	LEEVPIIKT	LTPYERSKI	ADALESQK	YPAGHEI	ILEGDPGHS	FFLLEAGEAAAFKRGN--
Mgrisea	LEEVPIIKT	LTPYERSKI	ADALETQK	YPGTVVIKE	GDPGEDFY	LLECGEAEAFKAGI--
Scerevisiae	LKSMPVLKS	LTTYDRAKL	ADALDTKI	YQPGETI	IIEGDDQGEN	FYLLIEYGAVDVSKKG---
SPombe	LQEVPIILSS	LDKYQRQKI	ADALLTVV	YQAGSIVIR	QDIGNQFY	LIEDGEAEVKNGK---
B emersoni	LEEVPIILSS	LEPYERHKA	DALESVAY	ADGDVVIR	QDIGNQFY	LIEDGEAEVKNGK---
UMaydis	LMDVPLFER	LSAAERAKIS	DSLELREYS	RGEAVISQ	GERGSEFF	IIVEGDAEVRKTKQG-
Celegans	LSKVQILAD	LDQWERVNV	ADALERCDF	EPGTHVVE	QGPGEFF	IILEGEANVLQK---
RI α	LSKVSILES	LEKWERLTV	ADALEPVQ	FEDGEKIV	VQGEPPDF	YIITEGTASVLQR---
RII α	IESVPLLLKS	LEVSERMKIV	DVIGEKVY	KDGERIITQ	GEKADSFY	IIESGEVSILIKSKTK
	: : : *	: * : *	: * :	: * : *	: * : *	: * :

	430	440	450	460	470	480
Ncrassa	-----	DSPVKNYKK	GDFFGELALL	NDAPRAAS	VISQT----	EVKVARLGKNAFQRL
Mgrisea	-----	DQPVKLYKK	GDFFGELALL	NDAPRAAS	VVSKT----	EVKVAALGKSAFQRL
Scerevisiae	-----	QGVINKLKH	DYFGEVAL	LDLPRQAT	VTATK----	RTKVATLGKSGFQRL
SPombe	-----	GVVVTQTK	GDFFGELALI	HETVRNAP	VQAKT----	RLKLATFDKPTFNRL
B emersoni	-----	GEEHHFRPL	HKGNYFGELALL	SDKPRVAT	IRAKG----	KLKCAKLGKKAFTRL
UMaydis	-----	GEE-VVGKL	SRGDYFGELALL	LNRR-CAAT	VAAAGATDD	ARLRVVMTSERAFTRL
Celegans	-----	RSDDAPFD	VVGHLMGSDY	FGELALLL	DRPRAATV	VAKT-----HLKCIKLDNRFRERV
RI α	-----	RSPNEEYVE	VGRGLGPSDY	FGELALLL	NRPPRAATV	VARG-----PLKCVKLDRPRFRERV
RII α	-----	VNKDGENQE	VEIARCHKGQY	FGELALVT	NKPRAASAY	AVG-----DVKCLVMDVQAFERL
		.	****:	**:	:	*. :

	490	500	510	520	530	540
Ncrassa	LGPIESILRR	TR-----	Y-----	VEAEE-----	-----	VDPLQVS--
Mgrisea	LGPVEPIMR	TR-----	YDAIKTG	VEE-----	-----	MDPLQAA--
Scerevisiae	LGPAVDVLK	LN-----	-----	-----	-----	DPTRH--
SPombe	LGNAIDLNR	NQP-----	-----	RRMGMDNKY	-----	GDQSLHRSP
B	LGPLADI	-----	-----	MQRNTQ-----	-----	DYEKYPGE
UMaydis	LGPLAGFSR	GMPRRRMATS	IRRYMRMR	MTQRRRQQR	ALARSGADT	SFPHPMDS
Celegans	MGPVREIL	KR-----	-----	-----	-----	DVSNYNSY
RI α	LGPCSEIL	KR-----	-----	-----	-----	NIQRYNSF
RII α	LGPCMDIM	KR-----	-----	-----	-----	NISHYEEQ
	: *	.				:

	550
Ncrassa	-----
Mgrisea	-----
Scerevisiae	-----
SPombe	PSTKA-----
B emersoni	H-----
UMaydis	GAWSAPNPFA-----
Celegans	VKLMT-----
RI α	ISLTV-----
RII α	LVKMEFGSSMDLIDPGQ

Referencias:

Neurospora crassa (NCrassa); Magnaporthe grisea (Mgrisea); Saccharomyces cerevisiae (Scerevisiae); Schizosaccharomyces pombe (SPombe); Blastocladiella emersonii (Bemersonii); Ustilago maydis (UMaydis); Caenorhabditis elegans (Celegans); RI α y RII α bovinas.