

**Tesis de Maestría
Biología Molecular Médica
Universidad de Buenos Aires**

**Estudio del Mecanismo de Fosforilación de la Proteína Quinasa
dependiente de cAMP de *S.cerevisiae***

**Studies of Phosphorylation Mechanism of cAMP-dependent
Protein Kinase of *S. cerevisiae***

Bioquímico Marcelo Pugliesi

**Directora de Tesina: Dra. Silvia M. Moreno de Colonna
Co - Directora de Tesina: Dra. Paula Portela**

Laboratorio Biología Molecular - Depto. Química Biológica



**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires**

Marzo de 2006

Estudio del Mecanismo de Fosforilación de la Proteína Quinasa dependiente de cAMP de *S.cerevisiae*

Resumen

En *S. cerevisiae*, la Proteína Quinasa dependiente de cAMP (PKA) controla una muy amplia variedad de procesos. Su activación juega un papel central en el control de la glucólisis y gluconeogénesis, movilización de carbohidratos como trehalosa y glucógeno, represión de genes de resistencia al estrés y control de la proliferación celular. La PKA en mamíferos ha demostrado ser una fosfoproteína con múltiples sitios de fosforilación, que tienen influencia sobre el ensamblado de una enzima activa y/o sus propiedades cinéticas. En *S. cerevisiae*, la isoforma Tpk1 presenta un cambio en su estado de fosforilación dependiente del estado metabólico de la célula. Las células creciendo en fuentes de carbono no fermentables o en fase estacionaria presentan isoformas de Tpk1 con bajo grado de fosforilación. Cuando estas células reciben un estímulo de glucosa, Tpk1 aumenta su grado de fosforilación, incrementando así su afinidad por el sustrato. La fosforilación reversible de Tpk1, dependiente de la presencia de glucosa, agrega un nuevo nivel de control de la actividad quinasa, además de los clásicos como: regulación por subunidad R, dominios de cAMP y localización. El mecanismo molecular de fosforilación de Tpk1 inducido por glucosa no ha sido caracterizado, como así tampoco si ocurren cambios similares en las otras isoformas Tpk2 y Tpk3. Tampoco se han realizado análisis de los posibles residuos a ser fosforilados en estas proteínas. Con el objetivo de responder a estos interrogantes, hemos realizado experimentos que sugieren que Tpk1 sufre fosforilaciones por un mecanismo autocatalítico e intramolecular. Además, Tpk3 podría estar regulada por modificaciones similares, no sucediendo lo mismo con la isoforma Tpk2. Por último, para un primer abordaje de caracterización de los sitios de fosforilación, realizamos un análisis *in silico* de Tpk1. De este análisis surgieron péptidos derivados de la secuencia de dicha proteína que fueron utilizados como sustrato en ensayos quinasa que señalan que el residuo Ser¹⁷⁹ es un candidato a sufrir fosforilación.

Palabras Clave: PKA, levadura, fosforilación, autocatalítico

Studies of Phosphorylation Mechanism of cAMP-dependent Protein Kinase of *S. cerevisiae*

Summary

In *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent Protein Kinase (PKA) controls a very wide variety of processes. Its activation plays a central role in the control of glycolysis and gluconeogenesis, mobilization of carbohydrates such as trehalose and glycogen, stress-resistant gene repression and cellular proliferation control. In mammals, PKA has proved to be a phosphoprotein with multiple phosphorylation sites, which influence the assembly of an active enzyme and/or its kinetic properties. In *S. cerevisiae*, Tpk1 isoform shows a change in its phosphorylation state according to the metabolic status of the cell. The cells growing on non-fermentable carbon sources or stationary phase present less phosphorylated Tpk1 isoforms. When these cells are stimulated with glucose, Tpk1 increases its phosphorylation degree and its affinity toward substrates. Reversible phosphorylation of Tpk1, which is highly dependent on glucose, adds a new level of control of kinase activity, apart from those classics such as R subunit regulation, cAMP domains and localization. The glucose-induced molecular mechanism of phosphorylation of Tpk1 has not been characterized, nor if similar changes occur in the other isoforms, Tpk2 and Tpk3. Candidate residues for phosphorylation have never been analyzed in these proteins. With the aim of answering these questions, we have conducted some experiments that suggest that Tpk1 undergoes phosphorylation by an autocatalytic and intramolecular mechanism. Furthermore, Tpk3 could be regulated by similar modifications while Tpk2 could not. Finally, as a first approach to the characterization of phosphorylation residues, we made an *in silico* analysis of Tpk1. This analysis gave rise to peptides derived from the Tpk1 sequence that were used as substrates in kinase assays and that indicate that Ser¹⁷⁹ is a candidate to be phosphorylated.

Key words: PKA, yeast, phosphorylation, autocatalytic

Gracias a los del laboratorio...

A **Silvia Moreno** que me dió la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por lo tanto es la responsable número uno de esto. Incluso me invitó a quedarme más allá de la tesina y no pudo ser. Antes que nada una excelente persona. Su capacidad científica y su dedicación son un ejemplo para todos los que trabajamos con ella.

A **Pau**. Si Silvia fue la que me dió el lugar, sin dudas Pau fue la que me hizo trabajar. Pasó de dirigirme a trabajar a la par mía, y llegó a ser mi becaria. Terminó siendo Co-Directora para los papeles y Directora para mí, que es lo que vale. Ah, y me dice gordo, lo que tomaría como una muestra del afecto que nos tenemos si no fuese porque tengo panza.

A los chicos, Richard "**Dr. Mangold**" Neme Taul, Jose "**los quiero a todos**" Ocampo, Jime "**te escucho de atrás de la división del laboratorio**" Rinaldi, Iri "**ametralladora de preguntas**" Busowsky, Fiore "**lengua bífida**" Gallelo y Pía "**estoy a ambos lados del ecuador**" Valacco. A la no tan chica Elba "**silencio, estoy leyendo**" Pereyra. Porque hacen del laboratorio un lugar donde uno tiene ganas de ir a trabajar. Con buenas intenciones, sin competencias y tirando para el mismo lado. Encontré en ellos un grupo espectacular.

A la mano derecha de Silvia Moreno, aunque se siente a su izquierda, **Silvia Rossi**, por su dedicación y preocupación para que todo esté en marcha en el laboratorio y porque siempre estuvo para las consultas...y las críticas.

A "**Los Canepa**" por estar siempre dispuestos a dar una mano, desde prestar vinagre hasta el último microlitro de ATP γ [^{32}P]

Gracias a los de la vida....

A **mis viejos** por estar, por aconsejarme y por apoyarme siempre en lo que elijo aunque no sea lo que me aconsejaron...

A **Andrés** y a **José** por hacerme compañía durante el año, aunque se hayan abusado de mis aptitudes como amo de casa...

A **Leo**, aunque no haya hecho más que ser mi hermano no lo puedo dejar afuera.

A **Martha** y **Chiche** por darme la libertad de elegir hacer lo que más me gustaba.

A **María Ines** por haberme bancado un año lejos pero que no se note la distancia, salvo los últimos meses que sí se notó y me hizo remar como loco...

INDICE

Introducción General	2
Objetivos Generales y Particulares	3
Proteína Quinasa dependiente de cAMP - PKA	4
- Subunidad catalítica	4
- Subunidad Regulatoria	9
- Holoenzima	10
- Sustratos de PKA	12
- Mecanismo de detección de glucosa y transducción de señales en <i>S. cerevisiae</i>	13
- Componentes de la vía cAMP-PKA	15
- Blancos de vía cAMP inducida por glucosa	18
Antecedentes	22
Resultados	24
• Análisis del mecanismo de fosforilación de Tpk1 durante el cambio de metabolismo respiratorio a fermentativo.....	24
• Análisis de fosforilación de Tpk2 y Tpk3.....	33
• Estudio de posibles sitios fosforilados en Tpk1	34
Discusión y Conclusiones	38
Conclusiones generales	41
Perspectivas	42
Materiales y Métodos	43
Bibliografía	49

INTRODUCCION GENERAL

La fosforilación reversible de proteínas intracelulares por proteínas quinasas regula numerosos procesos que incluyen modificaciones de la actividad enzimática, metabolismo celular, expresión génica, progresión del ciclo celular, rearrreglos del citoesqueleto, motilidad y diferenciación. La mayoría de las vías de transducción de señales en células eucariotas utilizan este mecanismo de fosforilación reversible como mecanismo de regulación. Aproximadamente el 2 % del genoma humano codifica para estas proteínas, es decir que han sido identificadas alrededor de 500 quinasas, constituyendo lo que se conoce como el Quinoma Humano (Manning *et al.* 2002).

La **Proteína Quinasa dependiente de cAMP (PKA)** pertenece al grupo de las AGC quinasas y es el miembro mejor caracterizado de toda la familia de quinasas. Esta realiza la transferencia del fosfato γ del ATP al grupo hidroxilo de residuos de Serina (Ser) o Treonina (Thr) presentes en el sustrato de la quinasa. Esta fue la primera quinasa de la familia en ser cristalizada y además esta perfectamente caracterizada en sus propiedades bioquímicas. Por estas razones es modelo y objeto de estudio sobre los que se sustentan el resto de los miembros de la familia.

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

La PKA es una proteína estructural y funcionalmente conservada. El uso de *Saccharomyces cerevisiae* para el estudio de esta proteína permite comprender los mecanismos que regulan a la misma en organismos eucariotas superiores.

El objetivo general del laboratorio es contribuir al estudio del mecanismo de activación de la PKA dentro de la célula utilizando *S. cerevisiae* como modelo experimental.

Objetivos Generales

La subunidad C Tpk1 de *S. cerevisiae* aumenta su grado de fosforilación cuando células creciendo en fase estacionaria o en fuentes de carbono no fermentable reciben un estímulo de glucosa. Ese cambio transitorio es reversible y aumenta la afinidad por el kemptido (Portela y Moreno 2005). Si bien se sabe que la subunidad C de PKA es una proteína que puede tener distintos grados de fosforilación dentro de la célula, tanto en células de mamíferos (Moore *et al.* 2002) como en *S.cerevisiae* (Levin *et al.* 1990), esta es la primera vez en que se observa una regulación de la misma en una situación fisiológica. Nuestra hipótesis plantea que dicha modificación postraduccional se regula positivamente para sostener la capacidad fermentativa de la célula al máximo, y se regula negativamente para apagar la PKA en el estado estacionario de crecimiento o durante el metabolismo respiratorio. Por lo tanto la fosforilación reversible puede considerarse un nuevo mecanismo de control para la regulación fina de la actividad de PKA en respuesta a las condiciones ambientales.

Para verificar la hipótesis planteada es necesario desarrollar diversos objetivos tales como caracterizar el mecanismo molecular por el cual Tpk1 sufre el cambio dinámico en su estado de fosforilación. Identificar el/los aminoácidos en Tpk1 que son fosforilados como consecuencia de la re-configuración del metabolismo respiratorio al fermentativo y estudiar las consecuencias de la modificación sobre dicho proceso. Además, es necesario estudiar si las otras dos isoformas de la subunidad catalítica (Tpk2 y Tpk3) sufren la misma modificación postraduccional. También es importante estudiar cuál es la consecuencia fisiológica que trae aparejada la ausencia de fosforilación de la/las subunidades catalíticas.

Algunos de éstos serán abordados durante el desarrollo de esta tesina.

Objetivos Particulares

- Caracterizar el mecanismo molecular por el cual Tpk1 sufre un cambio en el patrón de fosforilación durante el cambio de metabolismo respiratorio a fermentativo y determinar si el mismo es de carácter intramolecular o intermolecular
- Estudiar si los cambios en el estado de fosforilación de Tpk1 también están presentes en las otras dos isoformas de las subunidades catalíticas de PKA en *S.cerevisiae*, Tpk2 y Tpk3.
- Identificar los residuos aminoacídicos que sufren las modificaciones por fosforilación en Tpk1. Para esto se utilizarán péptidos derivados de Tpk1 como sustratos en ensayos de fosforilación.

Proteína Quinasa dependiente de cAMP - PKA

La PKA es un heterotetrámero compuesto de dos subunidades C y dos R. La primera es la responsable de catalizar la transferencia de fosfato mientras que la segunda es la que le confiere dependencia al cAMP y la localización subcelular mediante el anclaje con otras proteínas. Cuando la concentración intracelular de cAMP aumenta en respuesta a un estímulo, dos moléculas de cAMP se unen cooperativamente a cada subunidad R, promoviendo la disociación de la holoenzima en dos subunidades C activas y un dímero de subunidades R con los cuatro sitios de cAMP ocupados (Figura 1).

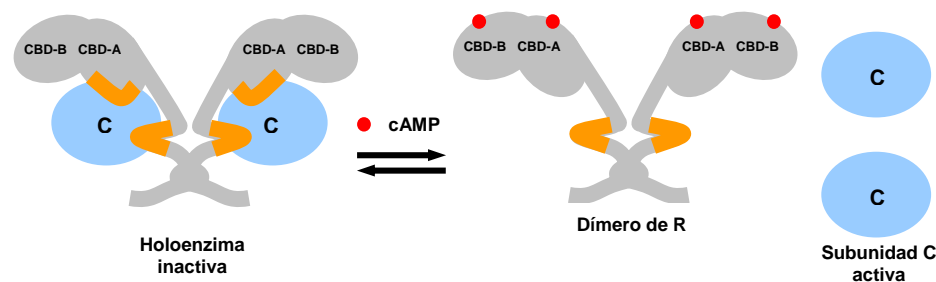


Figura 1 – Mecanismo de activación de la holoenzima de PKA por cAMP. El heterotetrámero, en presencia de cAMP, se disocia en un dímero de R (con los dos sitios de unión al cAMP ocupados) y dos subunidades C activas. Subunidad R en gris, subunidad C en celeste, cAMP en rojo. En naranja se observan los principales sitios de interacción RC, el sitio de pseudosustrato y una región del sitio CBD-A de unión a cAMP.

Subunidad catalítica

En mamíferos existen tres isoformas de subunidad catalítica $C\alpha$, $C\beta$ y $C\gamma$. Las subunidades $C\alpha$ y $C\beta$ difieren en un 7% en su secuencia de aminoácidos y mientras que la $C\alpha$ se expresa en todos los tejidos, la $C\beta$ es tejido específica. La isoforma $C\gamma$ presenta un 79% y 83% de identidad con $C\alpha$ y $C\beta$ respectivamente y su presencia se ha demostrado solo en testículo.

En *S. cerevisiae* la subunidad catalítica está codificada por tres alelos TPK1, TPK2 y TPK3. Las proteínas Tpk1 y Tpk3 presentan un 84 % de homología, y son 67% y 76% homólogas a Tpk2 respectivamente (Ptacek *et al.* 2005). Las mayores diferencias se encuentran a nivel del extremo N terminal, siendo las homologías mayores en C terminal (Toda *et al.* 1987a).

La actividad quinasa de las células de levadura está dada en su mayor medida por los alelos Tpk1 y Tpk2 mientras que la actividad de Tpk3 es muy baja debido a su baja expresión. Se puede establecer un orden de actividad PKA en *S. cerevisiae* donde Tpk2 > Tpk1 > Tpk3. (Mazón *et al.* 1993)

La delección de los tres alelos es letal para la levadura pero al menos uno de ellos es suficiente para mantener la viabilidad de la célula por lo que los alelos son genéticamente redundantes para el crecimiento. Sin embargo, un estudio reciente a nivel proteómico de *S.*

cerevisiae utilizando chips de proteínas como sustratos de quinasas determinó que cada alelo es funcionalmente diferente. En este estudio se reconocieron 256 sustratos para Tpk1, 29 para Tpk2 y 79 para Tpk3 donde solo 8 de ellos eran comunes para las tres quinasas y 39 eran reconocidos por dos de tres de ellas. La gran mayoría (87,7%) era reconocido por sólo una de las tres, indicando que cada quinasa posee una gran especificidad de sustrato a pesar de su estrecha relación genética (Ptacek *et al.* 2005) (Figura 2). Esto se correlaciona con trabajos previos que indican que cada subunidad catalítica posee diferentes roles en la diferenciación pseudohifal (Pan y Heitman, 2002).



Figura 2 – Comparación de sustratos de las diferentes TPKs. Cada quinasa tiene un único perfil de reconocimiento de sustrato; 86,6% de los sustratos de la subunidad C α bovina también fueron sustrato de Tpk1

Estructura y relación estructura-función

Núcleo catalítico

La subunidad catalítica de mamíferos tiene una longitud de 350 aminoácidos. El plegamiento del núcleo catalítico (residuos 40 a 280) está extremadamente conservado y es común a todas las proteínas quinasas. Consiste en dos lóbulos o subdominios (Fig. 3A). El **lóbulo menor** (N-terminal) o lóbulo N, está formado por 5 láminas β y una α hélice predominante llamada hélice C. El **lóbulo mayor** (C terminal) o lóbulo C, está formado principalmente por α hélices pero posee cuatro láminas β con funciones importantes (Fig. 3B) (Knighton *et al.* 1991).

Entre ambos lóbulos se forma una hendidura donde se une el ATP, principalmente a través de un loop altamente conservado denominado P loop (por loop de unión a fosfato). El loop P, que se encuentra entre las láminas β_1 y β_2 , es rico en Glicina y tiene el consenso GXGX Φ G, donde Φ es usualmente Tyr o Phe. Las glicinas (G) le dan flexibilidad al loop y coordinan la unión al ATP mientras que el residuo aromático cubre el sitio de transferencia de fosfato (Huse *et al.* 2002).

La Lys⁷², perteneciente al lóbulo menor, se encuentra en la hendidura formada entre los lóbulos. Este es uno de los residuos más conservados del núcleo catalítico y está conservado en absolutamente todas las quinasas conocidas (Fig. 4B). Normalmente la mutación de este residuo es utilizada para crear mutantes sin actividad catalítica. La Lys⁷² es responsable de establecer el contacto con los fosfatos α y β del ATP así como de interactuar con otro residuo conservado, el Glu⁹¹ perteneciente a la hélice α C del lóbulo menor, estabilizándolo en una conformación activa (Fig. 4A).

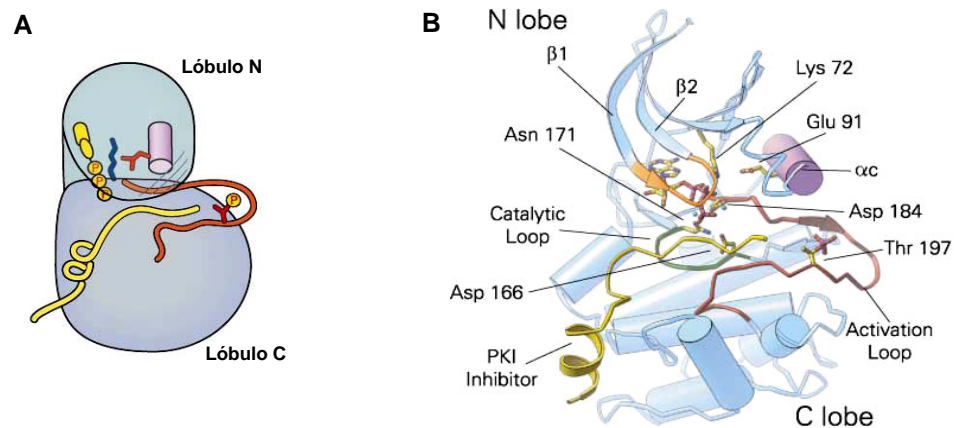


Figura 3 – Subunidad α bovina complejada con Mg-ATP y el inhibidor PKI (A) Esquema de la estructura general. Se resaltan la αc hélice (violeta) que contiene el Glu⁹¹ (rojo) en contacto con la Lys⁷² (azul), la Thr¹⁹⁷ fosforilada en el loop de activación (rojo) y el PKI (amarillo) apoyado sobre dicho loop y en contacto con otras regiones del lóbulo mayor. El ATP (amarillo en lóbulo N) se encuentra próximo tanto a la Lys⁷² como al sustrato.

(B) Estructura cristalina de la misma PKA representada en un modelo de cintas. Los elementos estructurales principales están coloreados como sigue: loop de activación, rojo; αc hélice, violeta; P-loop, naranja; loop catalítico, verde. PKI, amarillo. Están indicados el nucleótido unido y los residuos más conservados.

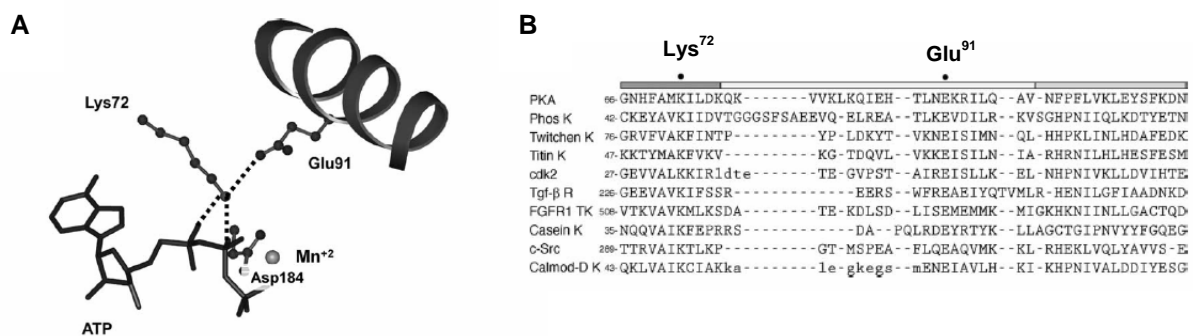


Figura 4 – Esquema de las interacciones de Lys⁷² en α C bovina (A) Localización de la Lys⁷² en la subunidad C mostrando la interacción con el ATP (fosfatos α y β), Asp¹⁸⁴ (Loop de posicionamiento del Mg) y Glu⁹¹ (hélice C). **(B)** El alineamiento de secuencias de quinasas representativas demostrando la conservación de la Lys⁷² en la familia de las AGC quinasas.

El lóbulo mayor contiene varios motivos conservados importantes para la actividad de la enzima como el **loop catalítico** y el **segmento de activación** que abarca unos 20 a 35 residuos. Este último se descompone en tres partes de N a C terminal, el **loop de posicionamiento del magnesio**, el **loop de activación** y el **loop P+1**. El loop catalítico contiene los residuos conservados Asp¹⁶⁶ y Asn¹⁷¹. El primero es el responsable de interactuar con el hidroxilo del sustrato, es decir que es la base catalítica, y el segundo es el que orienta a dicho hidroxilo para su correcto posicionamiento. A su vez Asn¹⁷¹ junto al Asp¹⁸⁴ son los responsables de unión del catión divalente en el loop de unión al Mg. El loop de activación contiene otro residuo conservado, la Thr¹⁹⁷, la cual se encuentra constitutivamente fosforilada en la subunidad C de mamíferos. Este grupo fosfato interactúa con varios residuos y los mantiene en su orientación adecuada y además, mediante estas interacciones es el responsable de hacer que el loop de activación permanezca en una forma extendida. Esta conformación es la que le permite a dicho loop servir como base para el apoyo del sustrato

cuando éste interacciona con la proteína para ser fosforilado (Fig. 3A). El loop P+1, es denominado así porque interactúa con el residuo +1 de la secuencia del sustrato a ser fosforilado (el residuo fosforilable Ser o Thr se considera la posición 0, ver Sustratos de PKA) (Nolen *et al.* 2004).

Recientemente se ha resuelto la estructura cristalina de Tpk1 de *S. cerevisiae*. El cristal fue obtenido de una delección aminoterminal de los primeros 80 aminoácidos, Tpk1 Δ^{1-80} . Dicha estructura reveló que la proteína presenta una estructura bilobular conservada respecto de la subunidad C α de mamíferos (Mashoon *et al.* 2001).

Regiones amino y carboxilo terminales

Las regiones N y C terminal que flanquean el núcleo catalítico son las más divergentes en toda la familia de las quinasas. En la PKA de mamíferos los últimos 70 aminoácidos del extremo carboxilo se extienden sobre la superficie de la enzima desde la parte inferior del lóbulo mayor a la superior del lóbulo menor y participan en el reconocimiento del péptido y del nucleótido (Knighton *et al.* 1991). Además, en el extremo C terminal se encuentra una secuencia consenso de fosforilación para la quinasa PDK1 (ver más adelante). El extremo amino, que abarca los primeros 40 residuos, contiene una secuencia consenso de miristilación que aporta a la estabilidad de la enzima (Yonemoto *et al.* 1993a, Zheng *et al.* 1993).

Modificaciones halladas en la subunidad catalítica

En mamíferos se han hallado dos tipos de modificaciones post traduccionales en la subunidad C. Uno de ellos, mencionado anteriormente es la miristilación en la región N terminal de la proteína que cumple la función de estabilizar a la misma. Las otras modificaciones halladas son fosforilaciones en cuatro residuos, Ser¹⁰, Ser¹³⁹, Ser³³⁸ y Thr¹⁹⁷ (Toner-Webb *et al.* 1992, Yonemoto *et al.* 1993b y 1997). El análisis de la deficiencia en la fosforilación de dichos residuos fue realizado mediante la mutación puntual de los mismos por residuos Ala. Sólo los residuos Ser¹⁰, Ser³³⁸ y Thr¹⁹⁷ tienen efectos sobre la actividad de catalítica e interacción con la subunidad R.

El residuo de Thr¹⁹⁷, perteneciente al loop de activación, ha sido encontrado constitutivamente fosforilado cuando la proteína se aísla de tejidos. El residuo es muy resistente a la defosforilación por fosfatasas debido tanto a la protección que le confieren las interacciones con varios residuos como a la que le confiere el residuo nucleofílico de Cys¹⁹⁹. Recientemente se ha propuesto un mecanismo por el cual la Thr¹⁹⁷ puede sufrir un ciclo de fosforilación/defosforilación que active e inactive la quinasa. Cuando la Cys¹⁹⁹ se encuentra en forma oxidada, la Thr¹⁹⁷ puede sufrir defosforilación por fosfatasas y disminuir su actividad catalítica. Cuando se reduce la Cys la Thr puede ser refosforilada por una quinasa y recuperar su actividad (Humphries *et al.* 2005).

El posible mecanismo por el cuál se fosforila la Thr¹⁹⁷ involucra a la proteína PDK1 (**P**hosphoinositide **D**ependent **K**inase 1), una quinasa que es capaz de fosforilar y activar a varios miembros de la familia de las quinastas incluyendo PKC, PKB y S6 quinasa. PDK1 es capaz de fosforilar *in vitro* a la PKA en la Thr¹⁹⁷ y todavía no se la ha identificado como la quinasa que la fosforila *in vivo*. Sin embargo hay varias líneas de evidencia que la señalan como el principal candidato para realizar tal modificación (Cauthron *et al.* 1998, Moore *et al.* 2002). La subunidad C de mamíferos posee la secuencia consenso de fosforilación para PDK1 en el loop de activación. Además de esta secuencia en el loop de activación, para la fosforilación de la subunidad C de mamíferos PDK1 requiere una secuencia distal hidrofóbica presente en el extremo C terminal para reconocer a PKA como sustrato.

Se ha probado la existencia de homólogos de PDK1 en *S. cerevisiae*, PKH1 y PKH2. Estos genes son esenciales y funcionalmente redundantes (Casamayor *et al.* 1999, Roelants *et al.* 2004). Al igual que la subunidad C de mamíferos, las tres isoformas de Tpk poseen la secuencia consenso de fosforilación para PDK1 (o sus homólogos) en el loop de activación.

Recientemente se ha identificado que el mecanismo por el cuál se fosforila la Ser³³⁸ en la subunidad C de mamíferos es de tipo autocatalítico e intramolecular. Se postula que en primer lugar ocurre la fosforilación en Thr¹⁹⁷ dependiente de PDK1 (o una enzima similar a PDK1). Este primer evento es requerido para que la propia PKA catalice la autofosforilación del residuo Ser³³⁸ en forma intramolecular. Para este segundo evento es necesaria la actividad catalítica de la enzima y no se produce en mutantes L⁷² catalíticamente inactivas (Iyer *et al.* 2005).

En las tres isoformas de *S. cerevisiae* el residuo de Thr¹⁹⁷ también se encuentra conservado, siendo para Tpk1 el residuo Thr²⁴¹ y se ha encontrado fosforilado en el cristal Tpk1^{Δ1-80} (Masshoon *et al.* 2001). En *S. cerevisiae* la falta de fosforilación en Thr²⁴¹ se asocia un aumento de la Km para el Kemptido (sin afectar la actividad catalítica de la enzima) y a una disminución de la afinidad por la subunidad regulatoria (Levin *et al.* 1988, Levin y Zoller 1990).

Los otros residuos de Ser no se hallan conservados entre la C de mamíferos y la de *S. cerevisiae*. Sin embargo se han identificado varias isoformas de fosforilación de Tpk1 por electroforesis bidimensional. Un análisis de aminoácidos presenta fosfoserina y fosfotreonina con una mayor proporción de la primera (Levin y Zoller 1990). Dado que en la estructura cristalina el único residuo fosforilado identificado fue la Thr²⁴¹, se supone que las isoformas de fosforilación de Tpk1 observadas en el gel 2D poseen el resto de los posibles residuos fosforilables en el extremo amino no cristalizado o dependen de esta región para la fosforilación de la proteína.

Subunidad Regulatoria

La PKA es el efector primario de la señalización mediada por cAMP a través de la unión del nucleótido a la subunidad R, aunque también se pueden encontrar otros efectores como los canales iónicos regulados por cAMP CNG (**C**yclic **N**ucleotide **G**ated) o una pequeña familia de factores intercambiadores de nucleótidos de guanina GEF (**G**uanine Nucleotide **E**xchange **F**actors) involucrados en la regulación de proteínas relacionadas a Ras (Taskén y Aandahl 2004).

La subunidad R de la PKA cumple diversas funciones que van desde la captura e inhibición de la actividad catalítica de la subunidad C como la localización de la PKA mediante interacción con proteínas de anclaje.

En mamíferos existen dos tipos de subunidades R, R de Tipo I y Tipo II. Cada una de ellas está codificada por dos genes $R1\alpha$ y $R1\beta$, $R2\alpha$ y $R2\beta$. Entre ellas difieren en peso molecular, punto isoeléctrico, secuencia primaria, capacidad de autofosforilación, estructura y expresión tejido específico (Diller *et al.* 2001).

En *S.cerevisiae* la subunidad R está codificada por un único gen BCY1 que tiene una homología del 40% con las de mamífero (Toda *et al.* 1987b)

A diferencia de la subunidad C, la regulatoria posee una organización modular conservada. El dominio de dimerización y anclaje en posición N terminal, llamado D/D (*Dimerization/Docking Domain*), es un arreglo de cuatro hélices que también provee un sitio de anclaje para las proteínas AKAPs (*A Kinase Anchoring Proteins*). Los dos dominios de unión al cAMP se ubican en tandem en la región C terminal y se denominan CBD-A y CBD-B (*cAMP Binding Domain*). Separando el dominio de dimerización y los de unión a cAMP se encuentra una región bisagra flexible que contiene una secuencia inhibitoria similar a un sustrato (pseudosustrato) y que bloquea el sitio activo de la subunidad catalítica en ausencia de cAMP (Taylor *et al.* 2005). Las subunidades RI no pueden ser autofosforiladas por no poseer la Ser fosforilable en el sitio inhibitorio mientras que las subunidades RII sí la poseen. La fosforilación en este sitio reduce la afinidad entre las subunidades C y R. (Figura 5)

La subunidad R en *S. cerevisiae*, al igual que la RII de mamíferos, posee la secuencia de autofosforilación RRTSV en la región bisagra y la fosforilación en este sitio (Ser¹⁴⁵) también disminuye la afinidad entre R y C *in vitro* (Kuret *et al.* 1988). Se sabe que *in vivo* la fosforilación de éste residuo es importante para la aparición de varias isoformas de R pero su función exacta se desconoce (Werner-Washburne *et al.* 1991).

La delección del gen BCY1 provoca una desregulación de la actividad PKA en la célula, resultando en un fenotipo similar al presente en cepas con alta actividad PKA. En estas cepas se observa una alta tasa de glicólisis e inhibición de la gluconeogénesis que resultan en una incapacidad para crecer en fuentes de carbono no fermentable. Si a estas cepas se las hace

crecer en glicerol, se pueden hallar mutantes que revierten el fenotipo mediante la disminución de la actividad catalítica de la PKA (Cameron *et al.* 1988). Dichas mutantes de actividad disminuida, denominadas weak, se han caracterizado y permiten el estudio de fenotipos dependientes de PKA.

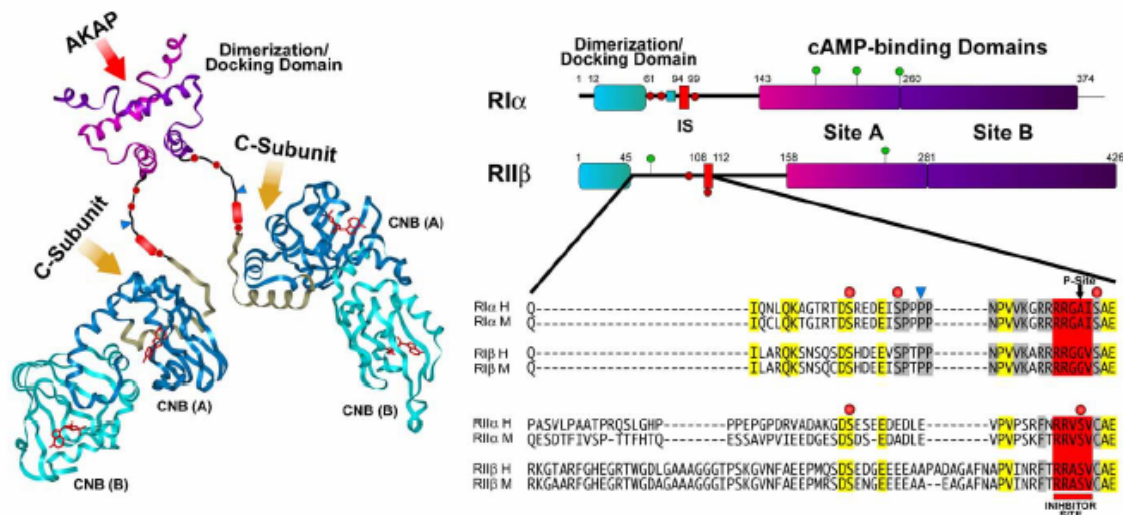


Figura 5 - A la izquierda un modelo de la subunidad RI de mamíferos mostrando los dominios estructurados CNB A y B con el cAMP y la región bisagra. Además se indican con flechas los sitios de interacción con C, con AKAPs y el sitio de dimerización. A la derecha se observa un esquema de la organización de las subunidades regulatorias de la PKA, la organización de los dominios de RI y RII donde se incluyen las regiones bisagra en detalle y en rojo la región de pseudosustrato.

Holoenzima

La holoenzima es un heterotetrámero formado por dos subunidades catalíticas y dos regulatorias tanto en mamíferos como en *S. cerevisiae*.

En mamíferos, tanto la subunidad R (RI α , RI β , RII α , RII β) como la subunidad C (C α , C β , C γ) poseen distintas propiedades físicas y biológicas, están diferencialmente expresadas y son capaces de formar diferentes isoformas de holoenzimas de PKA. Se las divide en dos grupos principales Tipo I y Tipo II según la subunidad R que las conforma, siendo las primeras más afines al cAMP y considerándoselas como solubles mientras que a las segundas se las considera particuladas y asociadas a estructuras subcelulares (ya que la mayoría de las AKAPs se unen a RII) (Taskén y Aandahl 2004).

En *S. cerevisiae* pueden formarse tres isoformas de PKA dependiendo de la subunidad C, Tpk1, Tpk2 o Tpk3, dado que hay una sola R.

Aunque previamente se habían identificado estructuras y residuos importantes en la interacción entre las subunidades C y R, recientemente se ha logrado cristalizar un complejo de holoenzima de mamíferos (RI α (91-244):C) que permite mapear dichos sitios (Kim *et al.* 2005). En primer lugar, la secuencia de pseudosustrato compuesta por residuos básicos se ancla al sitio catalítico compuesto por residuos ácidos. En segundo lugar el dominio CBD-A interacciona con el lóbulo mayor de la subunidad C. Además de estos sitios definidos de interacción es

indispensable tanto para la actividad catalítica de la subunidad C como para la interacción RC la fosforilación en la Thr¹⁹⁷ del loop de activación.

La holoenzima en *S. cerevisiae* difiere en varios aspectos bioquímicos con la de mamíferos. La afinidad entre subunidades R y C en la levadura es del orden de 20 nM mientras que en mamíferos es subnanomolar (Kuret *et al.* 1988). La afinidad decrece en mamíferos en el orden de 1000 veces con el agregado de cAMP (Kopperud *et al.* 2003). En *S. cerevisiae* el agregado de cAMP la afinidad R-C disminuye sólo 20 veces. Las explicaciones para estas diferencias se basan en las estructuras primarias de la subunidad R y a las modificaciones postraduccionales que sufren. La subunidad C de *S. cerevisiae* también es menos afín por el Kemptido¹ (20-30 veces menos) y por el PKI (inhibe menos a Tpk1 que a la C de mamíferos) (Zoller *et al.* 1988)

Mecanismo de activación

El mecanismo generalmente aceptado para la activación de la holoenzima es la disociación de la misma, en presencia de altas concentraciones de cAMP, en un dímero de R unido por el dominio DD y dos subunidades catalíticas activas. Sin embargo también se ha propuesto la participación del sustrato en el mecanismo de activación. Tanto estudios utilizando SAXS (**S**mall **A**nge **X**-ray **S**cattering) (Vigil *et al.* 2004) como el reciente cristal RI α :C obtenido (Kim *et al.* 2005) postulan un modelo de mecanismo de activación en donde el cAMP se asocia en primer lugar al dominio CBD-B de la subunidad R. La posterior asociación de cAMP al dominio CBD-A aumenta la accesibilidad del sustrato hacia el bolsillo catalítico de la subunidad C. Entonces el sustrato compite con el pseudosustrato de la subunidad R y completa la disociación de la holoenzima.

Localización de la PKA y Microdominios de cAMP

Dos formas de lograr especificidad de la PKA consisten en su localización en los sitios de acción, es decir la colocalización con su sustrato, o la generación de dominios de cAMP, lo que también lleva a una activación sitio específico.

La localización sitio específica de la PKA se ha estudiado en gran detalle en mamíferos. La misma está dada a través de proteínas de anclaje o AKAPs (**A**-**K**inase **A**nchoring **P**roteins) las cuales se unen a la subunidad R logrando la compartimentalización de la PKA. Las AKAPs se unen a la subunidad R mediante interacciones anfipáticas que se encuentran en los dominios DD y que se forman cuando la subunidad R se encuentra en forma de dímero. Se conocen cerca de 50 miembros de la familia de las AKAPs la mayoría de ellas se unen a las subunidades RII mientras sólo unas pocas lo hacen a las subunidades RI o a ambas, es decir con especificidad dual (Taskén y Aandahl, 2004).

¹ Ver Sustratos de PKA

Los cambios en las concentraciones de cAMP se generan mediante activación o inhibición de la Adenilato Ciclasa mediada por ligandos cuyos receptores son proteínas G asociadas a membrana. Sin embargo los niveles de cAMP generados en respuesta a un ligando específico están determinados por la localización y disponibilidad de dichos receptores y ciclasas acopladas a los mismos. Además, dichos dominios de cAMP están moldeados espacial y temporalmente por fosfodiesterasas y difieren en amplitud. Es muy posible que gradientes de cAMP generados por distintos ligandos estén específicamente organizados para seguir distintas rutas de señalización mediadas por PKA o incluso activar un único grupo de PKA localizado en determinada región mediante AKAPs para mediar su efecto biológico.

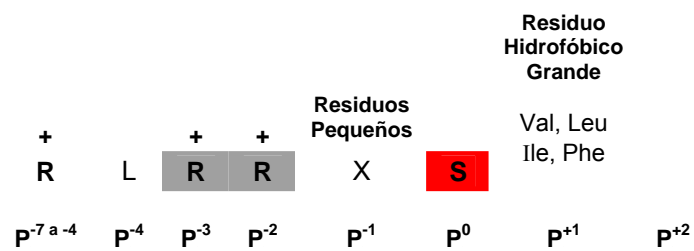
En *S. cerevisiae* no se han encontrado homólogos estructurales de las AKAPs. Sin embargo se ha probado que la proteína Zds1 afecta la localización de la PKA por lo que sería un análogo funcional. La delección de Zds1 disminuye la localización citoplasmática de PKA mientras que su sobreexpresión la aumenta (Griffioen *et al.* 2001). La fosforilación de la subunidad R también afecta su localización intracelular (Griffioen *et al.* 2003). La subunidad R fosforilada presenta una distribución núcleo/citoplasmática, mientras que cuando no está fosforilada se localiza preferentemente en núcleo. La localización de Tpk1 depende de la interacción con Bcy1 y por lo tanto de los niveles de cAMP.

La fuente de carbono también afecta la localización de la PKA. Cuando las células se encuentran creciendo en presencia de glucosa la PKA se localiza principalmente en el núcleo mientras que con fuentes de carbono no fermentable se localiza preferencialmente en citoplasma (Griffioen *et al.* 2002)

Sustratos de PKA

Además de los factores mencionados para lograr la especificidad de sustratos como la colocalización y la generación de dominios de cAMP, indudablemente el reconocimiento del sustrato por parte de la enzima es el más importante. Los requerimientos generales para el reconocimiento de un sustrato por la PKA fueron estudiados mediante péptidos sintéticos y sustratos fisiológicos. El término *secuencia consenso* se refiere a la secuencia primaria que rodea al residuo fosforilable y que es necesaria para el reconocimiento del mismo (Kennelly and Krebs 1991).

Los sitios de fosforilación obtenidos a partir de la recopilación de 100 sustratos fisiológicos permitió la definición de una secuencia consenso **RRXS/T** para PKA (Shaab 2001). Numerosos estudios *in vitro* empleando péptidos sintéticos son consistentes con la secuencia consenso definida.



Un sustrato que se usa universalmente para la determinación de la actividad de PKA es el **Kemptido**. Este es un heptapéptido sintético y su secuencia (LRRASLG) es derivada de un sustrato fisiológico de la PKA, la Piruvato Quinasa de hígado porcino.

Otros factores como estructura secundaria y terciaria o sitios de reconocimiento distales también influyen en el reconocimiento del sustrato. El cambio de residuos de la secuencia consenso tiene más influencia en un péptido que en una proteína demostrando que existen más factores que dicha secuencia para el reconocimiento como sustrato (Loog *et al.* 2002). Análisis de sitios hallados experimentalmente muchas veces no contienen la secuencia consenso completa, el 65-70% de los sitios fosforilables tienen una mayor tendencia a encontrarse expuestos en la superficie e incluso cada quinasa tiene predilección de un residuo fosforilable como Ser por sobre Thr (Kreegipuu *et al.* 1998). Un claro ejemplo de estos factores puede observarse en un sustrato fisiológico de la PKA en *S. cerevisiae*, la Piruvato Quinasa, que demostró tener una menor Kesp que el péptido derivado de ella debido a que el residuo fosforilable se encuentra en una región no expuesta de la estructura terciaria de la proteína (Portela *et al.* 2006).

Mecanismo de detección de glucosa y transducción de señales en *S. Cerevisiae*

La glucosa es el carbohidrato más utilizado como fuente de carbono y energía para la gran mayoría de las células eucariotas. Los organismos multicelulares como plantas y mamíferos, y los unicelulares como *S. cerevisiae*, tienen diversas formas de detectar los niveles de glucosa, que se traducen a través de mecanismos de señalización en una respuesta adecuada (Rolland *et al.* 2001). Los mecanismos de detección de nutrientes y señalización por parte de organismos inferiores se consideran como el origen de la transducción de señales que disparan hormonas y factores de crecimiento. Por esta razón, el estudio de la vía de señalización por glucosa en levaduras es un excelente modelo para la comprensión de fenómenos más complejos. *S.cerevisiae* es un eucariota unicelular que adopta diferentes tipos de metabolismo dependiendo de la fuente de carbono y la presencia o ausencia de oxígeno. *S. cerevisiae*, en presencia de glucosa prefiere la fermentación alcohólica a la respiración aún en condiciones aeróbicas a pesar del menor rendimiento energético por mol de azúcar que se obtiene frente a

un metabolismo respiratorio. Para ello la tasa de consumo de glucosa debe proceder a mucha mayor velocidad. Cuando las células de levadura están creciendo en fuentes de carbono no fermentables como etanol, glicerol o acetato, la adición de glucosa dispara una amplia variedad de procesos regulatorios que llevan al óptimo aprovechamiento de esta fuente de carbono. Su tasa de crecimiento es mayor que cuando realizan respiración. Tienen una alta tasa de glicólisis e inhibida la gluconeogénesis. La síntesis proteica y el RNA ribosomal están fuertemente inducidos y son más sensibles a diversas condiciones de estrés ambiental. Los carbohidratos como trehalosa y glucógeno son movilizados. A estas células se las denomina comúnmente *reprimidas* ya que la glucosa promueve la represión transcripcional de genes involucrados en la respiración, gluconeogénesis, captación y utilización de fuentes de carbono alternativas y de respuesta a estrés.

Sistemas de señalización por glucosa y sus sensores

Como ya mencionamos, la glucosa genera un estado de represión de la transcripción sobre células que crecen en esta fuente de carbono. A esta represión génica mediada por catabolito se la conoce como **vía principal de represión por glucosa** (Figura 6a). El mecanismo de detección para la activación de la vía es dependiente de la fosforilación de la glucosa (sin mediar metabolización de la misma) por una de las tres enzimas quinasas, Hexoquinasa (Hxk) 1 y 2 y Glucoquinasa (Glk1). La más importante para la represión a largo plazo la Hxk2 mientras que cualquiera de las tres puede mediar la rápida represión inicial.

La glucosa también genera la inducción de genes, sobre todo transportadores de glucosa (Hxt), en la vía conocida como **vía de inducción por glucosa** (Figura 6b). La detección de glucosa que media la activación de esta vía es mediada por dos homólogos de transportadores pero que actúan como transductores de señal: Snf3 y Rgt2.

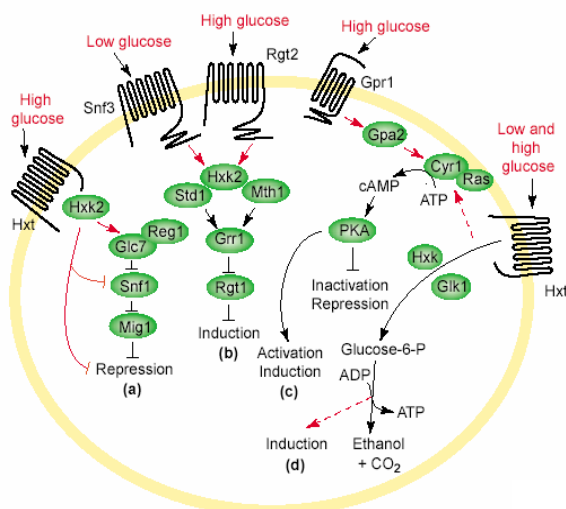


Figura 6 – Detección de glucosa en *S. cerevisiae*.

(a) Sistema de represión por glucosa dependiente de Hxk2 y mediado por Snf1, una quinasa que fosforila al represor Mig1 y lo inactiva en ausencia de glucosa. (b) Las vías de señalización mediados por Snf3 y Rgt2 controlan la expresión de transportadores de glucosa ante niveles de glucosa bajos y altos respectivamente. (c) La activación de la vía de cAMP requiere tanto del sistema de Gpr1-Gpa2 como la fosforilación de la glucosa. Esta vía activa la glicólisis, inhibe gluconeogénesis, induce genes relacionados al crecimiento y reprime genes relacionados con respuesta a estrés. (d) Inducción de genes glicolíticos por glucosa todavía poco definido.

La tercer vía mejor descripta dentro de las inducidas por glucosa es la **vía cAMP-PKA** (Figura 6c). Esta vía es el mecanismo principal de regulación postraduccional y postranscripcional mediante fosforilaciones. El agregado de glucosa a células creciendo en fuentes de carbono no fermentables o en fase estacionaria causa un aumento rápido y transitorio en los niveles de cAMP. El principal efector de esta vía es la PKA y su activación genera una cascada de fosforilaciones que median la transición del estado desreprimido no fermentativo al reprimido fermentativo.

Otras vías de señalización involucrarían la metabolización de la glucosa para la inducción completa de ciertas enzimas glicolíticas (Figura 6d)

Componentes de la vía cAMP-PKA

La síntesis de cAMP a partir de ATP está catalizada por la **Adenilato Ciclasa (Cdc35/Cyr1)**. Dado que el cAMP es esencial para la levadura, los mutantes delecionados de dicha proteína no son viables. La misma se localiza en la periferia membrana plasmática (no anclada a ella como la de mamíferos), posiblemente interaccionando con otras proteínas que la mantienen en esa localización. Posee un dominio catalítico C terminal y una región N terminal de longitud variable seguido por un dominio con el que interactúa con las proteínas de unión a GTP Ras. En mamíferos la AC es estimulada o inhibida por las subunidades α de proteínas G heterotriméricas. En *S. cerevisiae* la activación de la AC está mediada por las proteínas Ras y por Gpa2 aunque sólo se ha demostrado la unión directa con la primera.

Las proteínas **Ras1** y **Ras2** de *S. cerevisiae* pertenecen a la familia de proteínas G monoméricas (que incluye a la familia de pequeñas GTPasas). Los miembros de ésta familia son activas cuando tienen unido GTP, molécula a la cual hidrolizan a GDP transcurrido un tiempo y se tornan inactivas. Proteínas asociadas a Ras como **Cdc25** y **Sdc25** (Proteínas GEF **Guanine Exchanging Factors**) aceleran el intercambio de nucleótidos GDP por GTP y por lo tanto son activadoras de Ras mientras que las proteínas **Ira1** e **Ira2** (Proteínas GAP **GTPase Activating Proteins**) aceleran la hidrólisis de GTP por Ras y se comportan como inhibidores. La deleción de ambos alelos de Ras es letal para la levadura y mutantes constitutivamente activas como la Ras producen una estimulación permanente de la vía de cAMP-PKA en levaduras. Las mismas se hallan ancladas en la membrana plasmática mediante un farnesilo en su región C terminal. (Thevelein and de Winde, 1999)

Activación de la vía de cAMP

Como ya mencionamos, la síntesis de cAMP en levaduras está realizada por la AC. Esta enzima a diferencia de lo que ocurre en mamíferos donde solo está controlada por un sistema de GPCR (**G Protein Coupled Receptor**), en *S. cerevisiae* está bajo el control de dos sistemas aparentemente independientes. Uno es el de Ras y el otro el de **Gpr1**, un receptor de la familia GPCR (Fig.7).

Se conocen sólo dos estímulos que generan un incremento en los niveles intracelulares de cAMP. Uno de ellos es la acidificación intracelular y el otro la glucosa (Thevelein *et al.* 1987).

La acidificación intracelular ejercería su efecto tanto a través de la inhibición de las proteínas Ira, lo que incrementa la actividad Ras y activación de AC como por un efecto directo sobre AC (Colombo *et al.* 1998).

El estímulo por glucosa es mediado por un sistema GPCR cuyo receptor para glucosa es **Gpr1**. Este fue el primer receptor descrito en células eucariotas capaz de sensar directamente nutrientes del medio. Se ha demostrado que la glucosa y la sacarosa actúan como ligandos agonistas del mismo (Lemaire *et al.* 2004). Este receptor, como todos los de la familia GPCR está asociado a una proteína $G\alpha$, **Gpa2**. Aunque no se ha demostrado interacción directa entre Gpa2 y AC, las mutantes que carecen de Gpa2 no son capaces de responder a los estímulos extracelulares de glucosa (Colombo *et al.* 1998). Además la actividad de Gpa2 se encuentra controlada por otra proteína **Rgs2** con función de proteína GAP (Versele *et al.* 1999). Recientemente han sido caracterizados los homólogos de las proteínas $G\beta$ **Gpb1** y **Gpb2** y $G\gamma$ **Gpg1** constituyendo junto a Gpa2 las tradicionales proteínas G heterotriméricas en mamíferos. Gpb1/2 actúan como inhibidores de Gpr1-Gpa2 (Harashima and Heitman 2002 y 2005). Gpb1/2 también poseen actividad sobre la vía de cAMP-PKA independiente de Gpr1-Gpa2 al igual que otras proteínas $G\beta$ pero su blanco de acción aún no se ha determinado (Lu and Hirsch 2005).

El sistema de activación Gpr1-Gpa2 requiere no sólo que la glucosa extracelular sea detectada por Gpr1 sino que exista un transporte y fosforilación de la glucosa para la activación de AC y aumento de cAMP (Kraakman *et al.* 1999, Rolland *et al.* 2001a).

Este sistema de detección de glucosa es necesario sólo para el breve lapso de cambio de metabolismo de respiratorio a fermentativo que ocurre con la adición de glucosa a células desreprimidas. Cuando se ha establecido el metabolismo fermentativo, es decir una vez que las células tienen un crecimiento sostenido en glucosa, el sistema Gpr1-Gpa2 ya no es esencial (Kraakman *et al.* 1999). Además durante este crecimiento en glucosa los niveles de cAMP son del mismo orden que los niveles basales hallados previos a la adición del carbohidrato al medio (Ma *et al.* 1997).

Retroalimentación negativa de la vía de cAMP

Un blanco importante de PKA *in vivo* es Pde1. Pde1 y Pde2 son las dos fosfodiesterasas de baja y alta afinidad respectivamente que controlan los niveles de cAMP. Pde1 está regulada por PKA. Cuando PKA fosforila a Pde1, esta sufre una activación que aumenta la capacidad de hidrólisis de cAMP ejerciendo la retroalimentación (Ma *et al.* 1999). Pde2 estaría relacionada a mantener los niveles basales de cAMP en fase estacionaria (Park *et al.* 2005).

Mutantes con baja actividad de PKA poseen niveles constitutivamente altos de cAMP debido a la falta de retroalimentación mientras que en cepas con alta actividad de PKA como una *bcy1Δ* los niveles de cAMP son muy bajos debido a la fuerte retroalimentación generada por la PKA (Mbonyi *et al.* 1990)

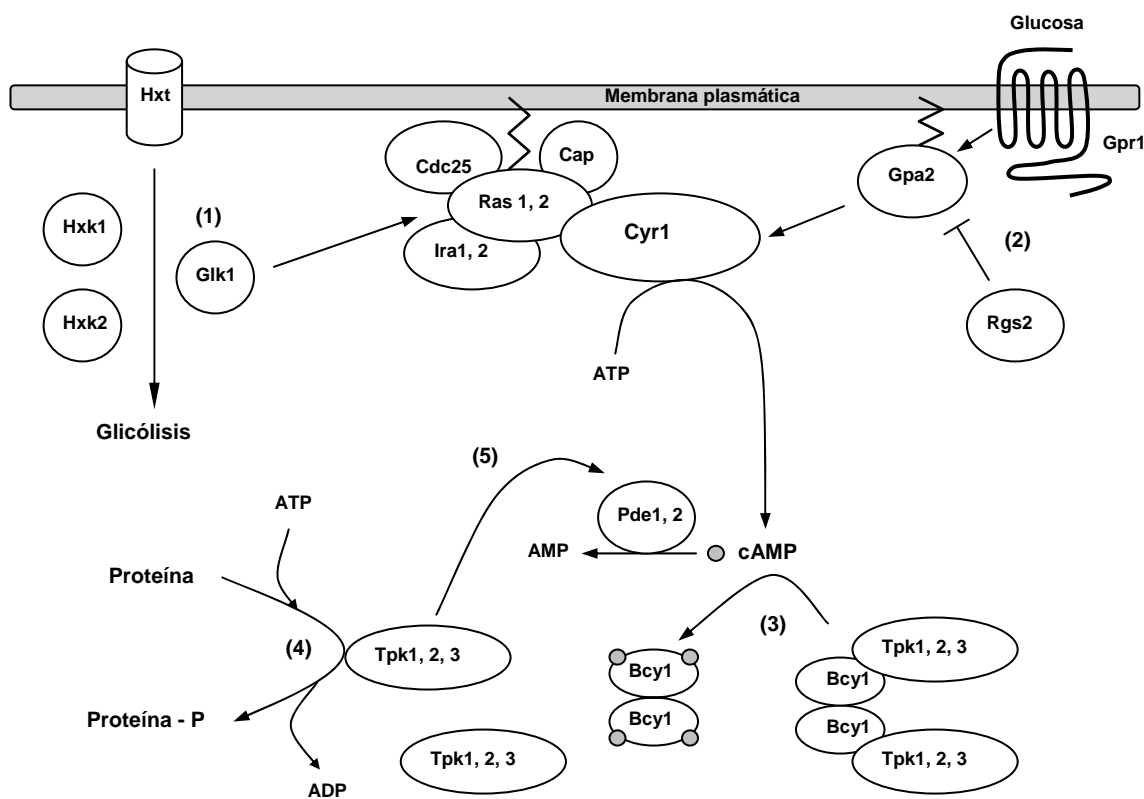


Figura 7 - Activación de la vía cAMP-PKA mediada por glucosa en *S. cerevisiae*. La activación de la vía ocurre cuando células crecidas en fuente de carbono no fermentable o en fase estacionaria son estimuladas por glucosa. La glucosa es detectada por dos sistemas: fosforilación de la glucosa intracelular por la glucoquinasa o hexoquinasas (1) y la detección de la glucosa extracelular por el sistema Gpr1-Gpa2 GPCR (2). El incremento de los niveles de cAMP intracelular promueve la activación de la PKA mediante la disociación de la holoenzima (3), lo cual permite la fosforilación de sustratos (4). Los niveles de cAMP son controlados vía el mecanismo de retroalimentación negativa ejercido principalmente sobre Pde (5).

Blancos de vía cAMP inducida por glucosa

La vía de cAMP a través de la PKA controla una variedad de propiedades que dependen de la composición del medio. Cuando las células se encuentran creciendo en fuentes de carbono fermentables, muestran bajos niveles de glucógeno y de trehalosa. También muestran baja expresión de genes de protección y respuesta a estrés y bajos niveles de tolerancia a varias condiciones de estrés. En estas condiciones de crecimiento y durante la fase exponencial, Tpk1 presenta isoformas con un mayor grado de fosforilación respecto de las mismas células cuando se aproximan a la fase estacionaria al realizar el cambio de metabolismo fermentativo a respiratorio (Portela y Moreno 2005). Este mayor grado de fosforilación de Tpk1 se asocia a una mayor afinidad por el Kemptido en ensayos de actividad cuando es usado como sustrato. No se conoce el estado de fosforilación de Tpk2 y Tpk3.

Por otro lado, cuando las células están creciendo en fuentes de carbono no fermentable como glicerol o etanol o se encuentran en fase estacionaria muestran el fenotipo opuesto, altos niveles de glucógeno y trehalosa y mayor resistencia al estrés. Al igual que en células creciendo en fase estacionaria, Tpk1 muestra isoformas con menor grado de fosforilación respecto de las que crecen en glucosa.

Mutantes con una vía de cAMP hiperactiva muestran fenotipos asociados a crecimiento fermentativo. Por el contrario, mutantes con baja actividad de PKA muestran características típicas asociadas a crecimiento con metabolismo respiratorio y fase estacionaria. Así el crecimiento fermentativo está asociado a un fenotipo de alta actividad de PKA (y mayor grado de fosforilación de Tpk1) mientras que el respiratorio a un fenotipo de baja actividad de PKA (y menor grado de fosforilación de Tpk1). Para mantener este fenotipo de alta actividad PKA no es necesario únicamente la presencia de un azúcar fermentable sino que también se requieren otros nutrientes esenciales. Esto postuló una vía llamada FGM (**F**ermentable **G**rowth **M**edium Induced Pathway) que es activa en presencia de un medio fermentable y un medio completo, para mantener el fenotipo de alta actividad de PKA. (Thevelein 1994). Además se postula el mantenimiento del estado fosforilado de Tpk1 durante el metabolismo fermentativo permitiría la máxima eficiencia de la enzima a lo largo de su crecimiento surgiendo como un nuevo mecanismo de control de actividad de PKA además de los ya conocidos como niveles de cAMP, inhibición por R y compartimentalización (Portela y Moreno 2005).

Nosotros hemos utilizado varias de las características fenotípicas descritas con el objetivo de medir la actividad de la vía cAMP *in vivo* en nuestros experimentos.

Carbohidratos de reserva trehalosa y glucógeno

La trehalosa es un disacárido (α -D-glucopiranosil-1,1- α -D-glucopiranosido) presente en muchos hongos. La principal característica de estos organismos es que pueden soportar grandes períodos de tiempo en casi desecación. En levaduras, la trehalosa no se detecta durante la fase exponencial de crecimiento pero puede acumularse hasta un 20% del peso seco durante la fase estacionaria de crecimiento. Si bien se ha considerado a la trehalosa como un carbohidrato de reserva, similar al glucógeno, esta idea ha cambiado gracias a propiedades inusuales de la trehalosa. Primero, no se acumula durante la fase exponencial (como lo hace el glucógeno), sólo se acumula cuando la glucosa comienza a escasear y su síntesis continúa durante la fase estacionaria, siempre cuando el glucógeno comienza a ser degradado. La trehalosa comienza a degradarse luego de largos períodos de hambreado y esto coincide con la pérdida de la viabilidad celular. In vivo, niveles elevados de trehalosa se correlacionan con alta resistencia al estrés y diversas condiciones de estrés inducen la acumulación de trehalosa (Neves *et al.* 1991). Por sus características, la trehalosa es un carbohidrato con funciones de protección más que de reserva de carbohidratos. La trehalosa es sintetizada en dos pasos a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-P. La enzima Tps1 (trehalosa-6-P-sintasa) cataliza la reacción desde el UDP-glucosa y glucosa-6-P a trehalosa-6-P; la enzima Tps2 (trehalosa-6-P-fosfatasa) cataliza la defosforilación final de la trehalosa-6-P a trehalosa. Además, el complejo proteico (formado por Tps1 y Tps2) posee dos subunidades regulatorias Tps3 y Tsl1 (Bell *et al.* 1998).

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

Los niveles de trehalosa se encuentran muy regulados por la actividad PKA. Mutantes que presentan alta actividad PKA son deficientes en acumular trehalosa en fase estacionaria o luego de condiciones de estrés suaves (por ejemplo estrés térmico suave). En contraste, mutantes con baja actividad PKA acumulan niveles altos de trehalosa, aún durante la fase exponencial sobre glucosa (Cameron *et al.* 1988). Se observa una buena correlación entre el aumento de actividad trehalasa y la señal vía cAMP inducida por glucosa (Thevelein *et al.* 1987). Además, se ha demostrado in vitro que el tratamiento de la trehalasa con fosfatasas la inactiva, y su actividad es restablecida por fosforilación con subunidad catalítica, lo que coincide con la incorporación de fosfatos en Nth1 (App y Holzer, 1989). No se ha caracterizado aún los sitios de fosforilación por PKA que son esenciales para la activación in vivo de la trehalasa (Wera *et al.* 1999). Además del efecto de PKA sobre la estimulación de la

degradación de la trehalosa, la expresión de los genes NTH1 (trehalasa neutra) (Züringer *et al.* 2000), TPS1 y TPS2 (Winderickx *et al.* 1996) es regulada por PKA vía un mecanismo dependiente de elementos STRE en sus promotores (ver luego).

A diferencia de la trehalosa, el glucógeno se comporta como un típico carbohidrato de reserva. Éste es sintetizado durante el crecimiento exponencial en glucosa y es degradado durante condiciones de hambreado. El glucógeno es sintetizado a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-P. La síntesis comienza por la auto-glicosilación de las proteínas Glg1 y Glg2. La glucógeno sintasa está codificada por la GSY1, GSY2 y GSY3. La degradación del glucógeno es catalizada por la enzima fosforilasa Gph1. Actividad de PKA alta inhibe la acumulación de glucógeno (Cameron *et al.* 1988). Tanto GPH1 como GSY2 contienen elementos STRE en sus promotores, siendo reprimidos por altos niveles de cAMP e inducidos durante el crecimiento diáuxico (Boy-Marcotte *et al.* 1998). Además, la proteína quinasa Snf1, la cual pertenece a la vía principal de represión por glucosa, juega un importante rol en la síntesis del glucógeno. Por lo tanto, la vía principal de represión por glucosa y la vía dependiente de cAMP, controlan los niveles de glucógeno en respuesta a las concentraciones extracelulares de glucosa (de Winderickx *et al.* 1996). Por último, en analogía a la sintasa de glucógeno de mamíferos, la cual es regulada por GSK (**G**lycogen **S**ynthase **K**inase), la fosforilación de Gsy1 y Gsy2 parece ser importante para su activación, pero no se han identificado aún proteínas quinasas o fosfatasa.

Control transcripcional de genes mediado por PKA, los factores Msn2 y Msn4

Al igual que sucede con la variación del tipo de metabolismo según la disponibilidad de nutrientes en el medio ambiente, las levaduras también deben adaptarse a otras condiciones como la temperatura, estrés osmótico y agentes químicos. Luego de que las primeras líneas de defensa actúen en la respuesta primaria rápida como lo hace la trehalosa, se dispara una serie de eventos secundarios como la inducción de genes que codifican factores con funciones protectoras. Muchos de estos genes se activan en forma conjunta dado que contienen en su promotor secuencias comunes. Una de estas secuencias es la denominada STRE (**S**tress **R**esponsive **E**lements). El elemento STRE posee una secuencia consenso AGGGG, en cualquier orientación y permite la inducción transcripcional por varios tipos de estrés (Ruis y Schuller, 1995). Los genes regulados por elementos STRE también son inducidos durante el crecimiento diáuxico. En mutantes con alta actividad PKA, los genes regulados por elementos STRE se encuentran reprimidos; mientras que en mutantes con baja actividad PKA, se expresan constitutivamente. Esto indica que la vía del cAMP regula negativamente la expresión génica mediada por elementos STRE. Algunos de los genes regulados por elementos STRE son: proteínas de estrés térmico (HSP104, HSP12, HSP26), genes involucrados en la resistencia a estrés oxidativo (CTT1, que codifica para una catalasa citosólica; SOD2, que

codifica para una superóxido dismutasa), la trehalosa sintasa (TPS1 y TPS2), la trehalasa neutra (NTH1), glucógeno sintasa (GSY2) y la glucógeno fosforilasa (GPH1).

Los factores de transcripción **Msn2** y **Msn4** son proteínas que poseen estructura tipo dedos de zinc Cys₂His₂, los cuales reconocen los elementos STRE (Martinez-Pastor *et al.* 1996). La regulación de la actividad del factor Msn2 es a través del control de la unión de éste al elemento del promotor. La localización intracelular de Msn2 y Msn4 depende de las condiciones de estrés. Durante la fase de crecimiento logarítmica, la localización de ambos factores es citoplasmática. Sin embargo, bajo condiciones de estrés o ausencia de glucosa en el medio extracelular, se concentran rápidamente en el núcleo. La localización de estos factores también depende de los niveles de actividad PKA ya que, la localización nuclear ocurre si los niveles de PKA son bajos. Alta actividad PKA podría entonces contrarrestar la importación nuclear disparada por el estrés, acelerar la exportación nuclear o cambiar la interacción con factores de retención localizados (Görner *et al.* 1998). La conexión entre el sistema PKA y los componentes transcripcionales de la respuesta a estrés es muy importante. La regulación negativa por parte de PKA sobre Msn2 y Msn4, y como consecuencia de los genes regulados por elementos STRE, es un requerimiento clave para el crecimiento y la viabilidad celular. Células de levaduras que carecen de PKA no son viables, pero la delección adicional de MSN2/MSN4 o del gen YAK1 permite el crecimiento (Smith *et al.* 1998).

Recientemente se ha demostrado que el dominio que contiene la señal de localización nuclear (NLS) en Msn2 es fosforilado tanto *in vivo* como *in vitro* por PKA. Se postula que cuando NLS está fosforilada Msn2 es retenido en el citoplasma y cuando esta desfosforilada Msn2 se localiza en el núcleo (Görner *et al.* 2002). Se ha observado que el estado de fosforilación del NLS es dependiente de la disponibilidad de glucosa en el medio, por lo que sugieren que la PKA es quien señala la disponibilidad de glucosa a Msn2.

Antecedentes recientes

En *Saccharomyces cerevisiae* la Proteína Quinasa dependiente de cAMP (PKA) controla una muy amplia variedad de procesos. Su activación juega un papel central en el control de la glucólisis y gluconeogénesis, movilización de carbohidratos como trehalosa y glucógeno, represión de genes de resistencia al estrés y control de la proliferación celular (Thevelein and de Winde 1999). La PKA es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades catalíticas (C) y dos regulatorias (R). Un aumento de cAMP intracelular disminuye la afinidad entre las subunidades R y C y su disociación en un dímero de subunidades R y dos subunidades C, permitiendo la subunidad C fosforilar diversos sustratos. La subunidad C está codificada por tres genes parcialmente redundantes en su función TPK1, TPK2 y TPK3 (Toda *et al.* 1987a) y la subunidad R está codificada por un único gen BCY1 (Toda *et al.* 1987b).

La glucosa es un activador de la vía de cAMP (Rolland *et al.* 2002). El agregado de glucosa a células creciendo en fuentes de carbono no fermentable produce un incremento rápido y transitorio en los niveles intracelulares de cAMP y la consecuente activación de la PKA, lo que conduce a una cascada de fosforilaciones de proteínas. Los niveles de cAMP retornan rápidamente a los basales por la hidrólisis catalizada por la fosfodiesterasa de baja afinidad, Pde1, como parte de un mecanismo de retroalimentación negativa mediado por la PKA activa. Se ha establecido que la señalización inducida por glucosa sería necesaria para una transición rápida del metabolismo respiratorio o fase estacionaria de crecimiento hacia un metabolismo fermentativo (Kraakman *et al.* 1999). El mecanismo de detección de glucosa que activa la vía de cAMP está compuesto por un receptor de membrana Gpr1, del tipo de los receptores asociados a proteínas G (GPCR) pero también requiere la internalización y fosforilación de la glucosa (Rolland *et al.* 2001a). Gpr1 es el primero de los receptores GPCR sobre el que se ha demostrado una interacción directa con la glucosa y la comprobación de que funciona como un receptor para este carbohidrato en *S. cerevisiae* (Lemaire *et al.* 2004).

Las proteínas quinasas han desarrollado múltiples mecanismos para controlar su actividad catalítica (Huse *et al.* 2002). Uno de ellos es la fosforilación del segmento de activación de la subunidad C (Nolen *et al.* 2004), pero también pueden sufrir fosforilaciones en otros sitios. La PKA en mamíferos ha demostrado ser una fosfoproteína con múltiples sitios de fosforilación que tienen influencia sobre el ensamblado de una enzima activa y/o sus propiedades cinéticas (Moore *et al.* 2002).

En *S. cerevisiae*, la isoforma Tpk1 presenta un cambio en su estado de fosforilación dependiente del estado metabólico de la célula. Células creciendo en fuentes de carbono no fermentables o en fase estacionaria presentan isoformas de Tpk1 con bajo grado de fosforilación. Cuando estas células reciben un estímulo de glucosa, Tpk1 aumenta su grado de fosforilación, incrementando su afinidad por el sustrato (Portela y Moreno 2005). De acuerdo a

estas observaciones interpretamos que la fosforilación reversible de Tpk1, ajustable o dependiente de la presencia de glucosa, agrega un nuevo nivel de control de la actividad quinasa. La fosforilación de Tpk1 actuaría positivamente cuando se requiere mantener el metabolismo fermentativo o negativamente cuando es necesario disminuir la actividad quinasa en fase estacionaria o metabolismo respiratorio.

Hasta el momento, el mecanismo molecular de fosforilación de Tpk1 inducido por glucosa no ha sido caracterizado, como así tampoco si cambios similares ocurren en las otras isoformas Tpk2 y Tpk3. Tampoco se han realizado análisis de los posibles residuos a ser fosforilados en estas proteínas. A partir de esto nos planteamos los siguientes objetivos.

Resultados

Análisis del mecanismo de fosforilación de Tpk1 durante el cambio de metabolismo respiratorio a fermentativo

Estudios previos demostraron que el estado de fosforilación de Tpk1 cambia cuando células creciendo en medio no fermentable como acetato o glicerol sufren la activación de la vía de cAMP-PKA inducida por glucosa. También se demostró que la presencia de Tpk1 activa era necesaria para realizar el cambio del estado de fosforilación (Portela y Moreno 2005). Sin embargo, dado que en *S.cerevisiae* la subunidad C está codificada por tres genes distintos, parcialmente redundantes en su función y con alta homología de secuencia entre ellos, evaluamos la posibilidad de que las fosforilaciones sobre Tpk1 puedan ser realizadas tanto por las isoenzimas Tpk2, Tpk3 o una quinasa heteróloga. Con el fin de comprobar si dichos cambios pueden ser realizados por alguna de dichas proteínas diseñamos una serie de experimentos en los cuales se comparó el cambio en el estado de fosforilación de Tpk1 inducido por glucosa en cepas que expresan una versión inactiva de Tpk1 y versiones activas de Tpk2 y Tpk3 (Tabla 1).

Para ello, extractos crudos de cultivos en fase exponencial fueron analizados mediante PAGE nativo antes (Tiempo 0) y después (Tiempo 5) del agregado de glucosa 100 mM, transferidos a nitrocelulosa y revelados con anticuerpos α - Tpk1. El comportamiento de una cepa salvaje muestra una mayor proporción de bandas con mayor migración electroforética luego del estímulo con glucosa (Figura 1, calles WT t0 y t5). El tratamiento previo de las muestras con fosfatasa alcalina provoca la desaparición las bandas de mayor migración y un incremento en la intensidad de la de menor migración. Esto indica que dichos cambios de deben a fosforilaciones de Tpk1 y que las bandas de mayor migración son las más fosforiladas (Fig. 1, calles WT +/- Pasa). La banda que se observa luego del tratamiento con fosfatasa puede deberse a una forma totalmente defosforilada o bien a una forma fosforilada resistente al tratamiento con esta enzima. En la C de mamíferos, la Thr¹⁹⁷ fosforilada, esencial para la actividad catalítica de la enzima, es resistente a la defosforilación in vitro (Toner-Webb *et al.* 1992). Es posible por lo tanto que la isoforma menos fosforilada de Tpk1, la cual presenta menor movilidad en los geles nativos, contenga fosfo-Thr²⁴¹ resistente a la defosforilación por fosfatasa alcalina. Los cambios mostrados en Tpk1 en respuesta a glucosa podrían ocurrir probablemente en otros aminoácidos no caracterizados aún.

Para analizar si Tpk2 o Tpk3 pueden modificar el estado de fosforilación de Tpk1, se utilizó una mutante de esta proteína en la Lisina¹¹⁶ (K116R) (homóloga a la Lys⁷² de mamíferos) que carece de actividad catalítica (Demlow and Fox, 2003). Este residuo pertenece al sitio catalítico de la enzima, se encuentra altamente conservado en toda la familia de proteínas quinasas y se lo utiliza frecuentemente para generar mutantes sin actividad catalítica. El análisis de la cepa

tpk1Δ + tpk1^d, no presentó el cambio en el patrón de motilidad después del agregado de glucosa, observándose sólo la isoforma de menor motilidad (Fig. 1, calles *tpk1Δ + tpk1^d* t0 y t5). Como control, la cepa *tpk1Δ + Tpk1* se comporta de la misma forma que la cepa salvaje (Fig. 1, calles *tpk1Δ + Tpk1* t0 y t5) indicando que la restauración de la actividad de Tpk1 es necesaria para observar el cambio.

Como conclusión, la aparición de isoformas de mayor grado de fosforilación de Tpk1 luego del estímulo con glucosa es dependiente de la actividad de Tpk1 y no depende de la actividad de Tpk2 o Tpk3, presentes en las cepas utilizadas.

Tabla 1 - Lista de cepas y características principales

Cepa	Características
W303 WT	Cepa salvaje
<i>Tpk1Δ</i>	Cepa W303 WT que no expresa TPK1. Expresa Tpk2 y Tpk3.
<i>Tpk1Δ + Tpk1</i>	Cepa <i>Tpk1Δ</i> transformada con plásmido centromérico con el gen TPK1 con su propio promotor.
<i>Tpk1Δ + tpk1^d</i>	Cepa <i>Tpk1Δ</i> transformada con plásmido centromérico con el gen <i>tpk1</i> mutado en la Lys ¹¹⁶ sin actividad catalítica en la proteína.

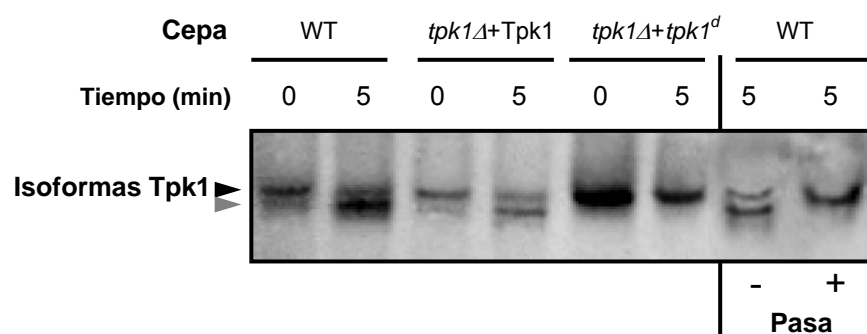


Figura 1 – La acumulación de isoformas con mayor grado de fosforilación de Tpk1 después de la activación de PKA inducida por glucosa no depende de Tpk2 ni Tpk3 y sí de la actividad de Tpk1. Células de la cepa salvaje W303-1A (WT); *tpk1Δ + Tpk1*; *tpk1Δ + tpk1^d*, fueron crecidas hasta fase exponencial en SDGli 2%. Extractos crudos antes (tiempo 0) y después (tiempo 5) de un pulso con glucosa 100 mM fueron corridos en PAGE nativos, transferidos y revelados con α -Tpk1. Las últimas dos calles representan extractos de tiempo 5 de una cepa salvaje sin y con tratamiento con fosfatasa alcalina. Las flechas negras y grises indican las bandas observadas antes y después del pulso de glucosa respectivamente.

La falta de cambio en el patrón de motilidad de Tpk1 en la cepa *tpk1Δ + tpk1^d* puede deberse a dos motivos. Uno sería la falta de actividad específica de Tpk1 que tiene la cepa utilizada. Otra sería la falta de activación de la vía de cAMP-PKA, que en la cepa utilizada está dada por Tpk2 y Tpk3. Para verificar la activación de la vía de cAMP-PKA y descartar esta causa empleamos dos abordajes. Uno de ellos fue la determinación de características fenotípicas controladas por la actividad de PKA como niveles de trehalosa y glucógeno y el otro la determinación de la actividad *in situ* de PKA empleando células permeabilizadas.

La trehalosa es un carbohidrato que se comporta tanto como un protector ante estrés celular como carbohidrato de reserva (Zähringer *et al.* 2000, Windericks *et al.* 1996). Este carbohidrato no se acumula durante la fase exponencial. Comienza a acumularse cuando la glucosa se consume y persiste cuando el glucógeno comienza a degradarse. La degradación de la trehalosa comienza luego de largos períodos de hambre coincidentemente con la pérdida de viabilidad de la célula. Dado que los altos contenidos de trehalosa intracelulares se correlacionan con la capacidad de la célula de soportar distintos tipos de estrés, este carbohidrato es considerado más como protector que como reserva. Los niveles de trehalosa están regulados por la actividad de PKA, siendo menores los niveles de trehalosa mientras más alta sea la actividad PKA en la célula (Cameron *et al.* 1988, Thevelein 1987). La PKA actúa tanto a nivel transcripcional como postraduccional para controlar el contenido de trehalosa. La activación de la vía cAMP-PKA inducida por glucosa promueve una rápida movilización de la trehalosa mediante la activación de la trehalasa neutra y la represión de los genes de la sintasa TPS1 y TPS2.

El glucógeno es un carbohidrato de reserva. Se acumula durante la fase exponencial y se degrada durante los períodos de carencia de nutrientes. Al igual que la trehalosa, sus niveles dependen de la actividad de PKA, siendo menores cuando la actividad PKA es mayor. Las cepas WT acumulan tanto glucógeno como trehalosa cuando crecen en nutrientes como glicerol o acetato, donde la actividad de PKA es baja. Por el contrario, cuando crecen en glucosa y la actividad de PKA es alta dichos carbohidratos se movilizan para su consumo.

La determinación de ambos carbohidratos se realizó sobre células crecidas hasta fase exponencial con glicerol como fuente de carbono e inducidas con un pulso de glucosa 100 mM, cosechadas por filtración y determinados como glucosa (como se indica en Materiales y Métodos 5). Los niveles de trehalosa sufren una disminución en las tres cepas utilizadas lo que concuerda con la activación de la vía de cAMP-PKA (Fig. 2A). Los niveles de glucógeno se comportan de manera similar, con un descenso para las tres cepas (Fig. 2B). Sin embargo la cepa *tpk1Δ + tpk1^d* tiene una cinética más lenta, observándose un leve retraso en los primeros 60 min. de la curva.

También evaluamos la actividad de PKA *in situ* en células permeabilizadas durante el pico de cAMP que se produce ante el agregado de glucosa 100 mM a células desreprimidas. Esta determinación, a diferencia de la determinación de fenotipos que miden cambios mediados por PKA, mide directamente la activación de la PKA durante el incremento de cAMP intracelular (Portela y Moreno 2005). La determinación de la actividad *in situ* de la PKA, indicó que en las cepas *tpk1Δ + Tpk1* y *tpk1Δ + tpk1^d* se produjo activación de la PKA durante la estimulación de los niveles intracelulares de cAMP evocados por el agregado de glucosa (Fig. 2C).

Como puede observarse, la actividad máxima alcanzada por ambas cepas resultó diferente, siendo aproximadamente un 50% menor en la cepa *tpk1Δ + tpk1^d*. Esto se debe al menor

contenido de actividad quinasa en la cepa que no expresa la versión activa de Tpk1. Como consecuencia, es esperable que algunos de los fenotipos controlados por PKA, en este caso la movilización de glucógeno, se vea afectado, como ocurrió en la cepa *tpk1Δ + tpk1^d*. Previamente se ha reportado que existe una jerarquía de actividad entre las isoformas de C presentes en *S. cerevisiae*, en orden Tpk2 > Tpk1 > Tpk3. Así mismo, cepas que sólo expresan Tpk1 o Tpk2 tienen aproximadamente el 50 % de actividad respecto de una cepa salvaje, indicando que la delección de uno de los genes TPK1 o TPK2 no es complementada por la sobreexpresión del otro gen. Además, cepas expresando sólo la isoforma Tpk3 presentan muy baja actividad quinasa como consecuencia de la baja expresión de la proteína (Mazón *et al.* 1993).

Estos resultados indican que en las cepas utilizadas se produjo la activación de la PKA, sobre todo en la cepa que nos interesa *tpk1Δ + tpk1^d* donde las moléculas de holoenzimas compuestas por Tpk2 y Tpk3 fueron activadas por el estímulo con glucosa. Por lo tanto, la falta de cambio en el patrón de fosforilación de la proteína *tpk1^d* es consecuencia de su inactividad catalítica y no una falta de activación de la vía cAMP-PKA.

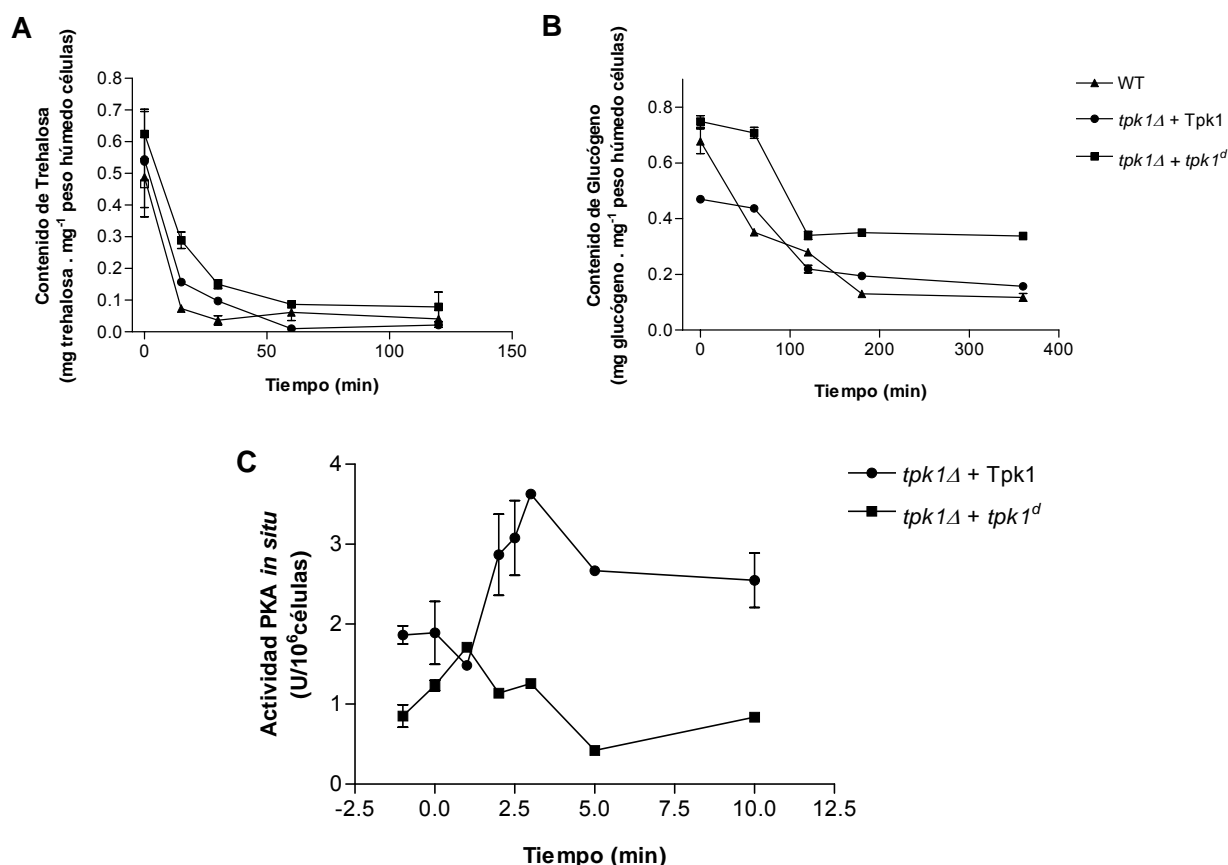


Figura 2 – Activación de la vía PKA mediada por glucosa. Células de las cepas W303-1A (WT); *tpk1Δ + Tpk1* y *tpk1Δ + tpk1^d*, fueron crecidas hasta fase exponencial en SDGli 2%. El estímulo con glucosa 100 mM fue realizado en el tiempo 0, que representa una muestra tomada inmediatamente antes de dicho estímulo. **Determinación de Trehalosa (A)** y **Glucógeno (B)**. A los tiempos indicados, las células fueron recolectadas por filtración, lavadas con agua fría y congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Las determinaciones de trehalosa y glucógeno fueron realizados por extracción y dosados como glucosa luego del tratamiento con trehalasa y amiloglicosidasa respectivamente. **(C) Determinación de actividad PKA in situ.** A los tiempos indicados, células fueron cosechadas en agua fría, centrifugadas y permeabilizadas en Tolueno: Etanol (1:4). Las mismas fueron utilizadas en un ensayo de actividad de PKA utilizando kemptido como sustrato + ATP γ [³²P] como se describe en materiales y métodos.

Para determinar si el cambio en el patrón de fosforilación de Tpk1 es mediado por un mecanismo intra- o intermolecular llevamos a cabo una serie de experimentos utilizando cepas con baja actividad de PKA *tpk1^{w1}*.

Esta cepa posee los genes TPK2 y TPK3 deletados mientras que el gen TPK1 posee una mutación (L217S) que lo torna parcialmente inactivo. La actividad quinasa es indetectable en dichas células empleando extractos crudos o células permeabilizadas (Portela *et al.* 2002). La baja actividad no se debe a baja expresión de la proteína ya que presentan niveles normales de *tpk1^{w1}* comparado con los niveles de Tpk1 de una cepa salvaje (Cameron *et al.* 1988). La actividad de la versión *tpk1^{w1}* mantiene a la célula viable, ya que en ausencia de las tres isoformas las células son inviables. Además estas células muestran incrementos duraderos de cAMP luego de estímulo con glucosa (Mbonyi *et al.* 1990) posiblemente debido a la falta de retroalimentación negativa de la vía de cAMP. También está aumentada la acumulación de carbohidratos, coincidentemente con aquellas cepas con baja actividad de PKA (Tatchell *et al.* 1985). El patrón de fosforilación observado en PAGE Nativos en estas cepas no varía cuando las mismas son estimuladas con glucosa (Portela y Moreno 2005). El uso de una cepa que sólo posee una versión *tpk1^{w1}*, sin cambio en el patrón de fosforilación evocado por glucosa, pero con una actividad mínima para la viabilidad, permite analizar sobre esta proteína la respuesta al complementarla con Tpk1, Tpk2 o Tpk3.

La cepa *tpk1^{w1}* fue transformada con diferentes plásmidos dando lugar a las cepas *tpk1^{w1}* + Tpk2, *tpk1^{w1}* + Tpk3 y *tpk1^{w1}* + Tpk1-GFP-HA (Tabla 2). Las dos primeras cepas sirven para corroborar los resultados obtenidos anteriormente que indicaban que la activación de Tpk2 y Tpk3 no produce el cambio en la fosforilación de Tpk1. La otra cepa se obtuvo con el objetivo de enfocarnos en el mecanismo molecular de la fosforilación de Tpk1. Si la fosforilación ocurre en *trans* entre moléculas de Tpk1 (es decir intermolecular), entonces la versión activa Tpk1-GFP-HA debe ser capaz de fosforilar a la versión *tpk1^{w1}* ya sea en forma directa o activando una quinasa capaz de fosforilar *tpk1^{w1}*. Contrariamente, si la fosforilación ocurre de manera intramolecular o *cis*, entonces la versión *tpk1^{w1}* no sufrirá ningún cambio mientras que Tpk1-GFP-HA sí lo hará.

Tabla 2 – Lista de cepas y características generales

Cepa	Características
W303 WT	Cepa salvaje
<i>Tpk1^{w1}</i>	<i>tpk1^{w1}</i> mutante con actividad muy reducida. No expresa Tpk2 y Tpk3. Tpk1 con actividad PKA indetectable.
<i>Tpk1^{w1}</i> + Tpk2	Cepa <i>tpk1^{w1}</i> transformada con plásmido centromérico con el gen Tpk2 con su propio promotor.
<i>Tpk1^{w1}</i> + Tpk3	Cepa <i>tpk1^{w1}</i> transformada con plásmido centromérico con el gen Tpk3 con su propio promotor.
<i>Tpk1^{w1}</i> + Tpk1-GFP-HA	Cepa <i>tpk1^{w1}</i> transformada con plásmido centromérico con el gen Tpk1 fusionado a GFP-HA bajo la actividad del promotor débil ADH (Alcohol Deshidrogenasa).

Para estos análisis, extractos crudos de dichas cepas en fase exponencial antes y después del agregado de glucosa 100 mM (tiempo 0 y 5 respectivamente) fueron corridos en PAGE nativos, transferidos a nitrocelulosa y revelados con α -Tpk1 o α -HA (Fig. 3A). El control de motilidad de los cambios en el estado de fosforilación fue realizado con una cepa salvaje, observándose los patrones ya descritos en la Fig.1 (Fig. 3A, calles WT t0 y t5).

En la cepa *tpk1^{w1}* se observan dos bandas, siendo mayoritaria la banda de menor migración y cuyo perfil de motilidad no cambia ante el estímulo con glucosa, lo que concuerda con resultados previos (Portela y Moreno 2005) (Fig. 3A, calles *tpk1^{w1}* t0 y t5). Esto se debe a que, como ya mencionamos, la proteína es una versión con actividad disminuida de PKA; esa mínima actividad es la responsable de la isoforma fosforilada de mayor migración electroforética. Las cepas *tpk1^{w1}* + Tpk2 y *tpk1^{w1}* + Tpk3 tampoco sufren cambios en el estado de fosforilación de la versión mutante *tpk1^{w1}* ante el estímulo con glucosa, coincidentemente con los resultados mostrados en la Fig. 1, donde estos cambios no dependían de los alelos TPK2 ni TPK3 pero si de la actividad de Tpk1 (Fig. 3A, calles *tpk1^{w1}* + Tpk2 o + Tpk3 t0 y t5).

La cepa *tpk1^{w1}* + Tpk1-GFP-HA nos permite discriminar por la diferencia en la migración (debido al tamaño del epítipo) entre la proteína *tpk1^{w1}* endógena de la plasmídica Tpk1-GFP-HA. Esta última tiene una motilidad menor en el gel nativo debido a su masa y es observada con el anticuerpo α -HA, mientras que el anticuerpo α -Tpk1 permite observar a Tpk1-GFP-HA y a *tpk1^{w1}* al mismo tiempo. Dado que Tpk1-GFP-HA, catalíticamente activa, no fue capaz de provocar un cambio en el estado de fosforilación de la endógena (Fig. 3A, calles *tpk1^{w1}* + Tpk1-GFP-HA α -Tpk1 t0 y t5. Observar la falta de cambio en ❶). Por esto, es poco probable que el mecanismo de fosforilación sea intermolecular, ya sea dependiente de Tpk1 o de otra quinasa.

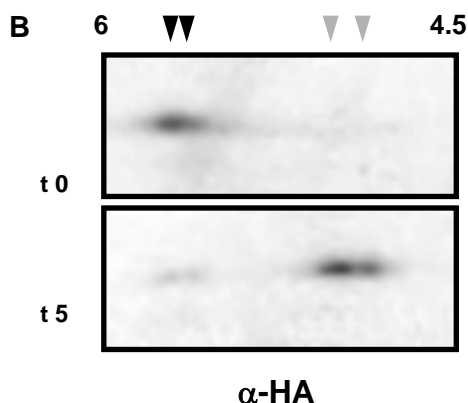
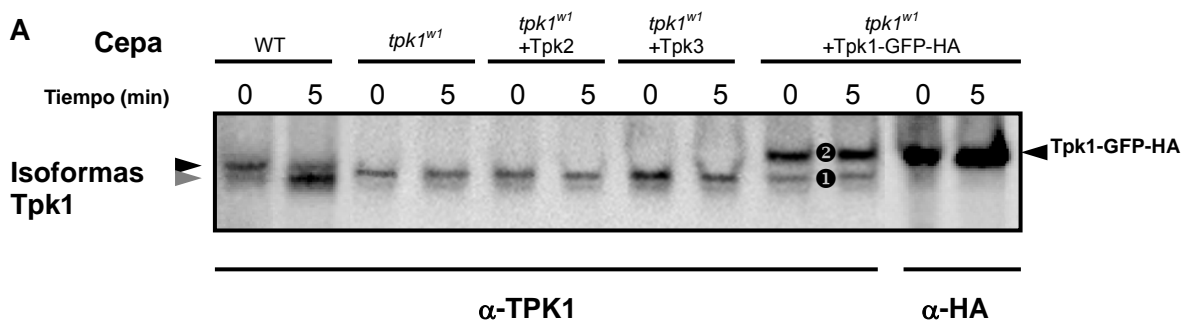


Figura 3 – (A) Células de la cepa W303-1A (WT) y *tpk1^{w1} tpk2 Δ tpk3 Δ* + Tpk2 ó + Tpk3 ó + Tpk1-GFP-HA fueron crecidas en SDGII 2% hasta fase exponencial. Extractos crudos fueron preparados antes (tiempo 0) y después (tiempo 5) del estímulo con glucosa 100 mM. Los extractos fueron corridos en PAGE nativos, transferidos y revelados con α -Tpk1 y α -HA. Observar la falta de cambio de movilidad en ❶ y ❷, que corresponden a las versiones *tpk1^{w1}* y Tpk1-GFP-HA respectivamente. Para más detalles ver texto.

(B) Extractos crudos de la cepa *tpk1^{w1}* + Tpk1-GFP-HA antes y después del estímulo con glucosa 100 mM fueron corridos en un gel 2D, transferidos a nitrocelulosa y revelados α -HA. Las flechas negras y grises indican las bandas o los manchas observados antes y después del estímulo con glucosa respectivamente. Para más detalles referirse a la sección materiales y métodos.

Sin embargo, tampoco observamos cambio en la motilidad de la versión Tpk1-GFP-HA empleando este método, que debería haberse producido ya que el mismo depende de la actividad de Tpk1 y lo que nos hubiese permitido suponer que el mecanismo es intramolecular (Fig. 3A, calles *tpk1^{wt}* + Tpk1-GFP-HA α -HA t0 y t5. Observar la falta de cambio en ②).

Nuestros resultados previos indicaban un cambio en el patrón de motilidad cuando existía actividad de Tpk1 (Fig. 1). Por esta razón decidimos realizar una electroforesis bidimensional con el objetivo de separar con mayor resolución las isoformas de fosforilación de Tpk1-GFP-HA. Los geles 2D se realizaron a partir de extractos crudos antes y después del agregado de glucosa 100 mM (tiempos 0 y 5 respectivamente) de la cepa *tpk1^{wt}* + Tpk1-GFP-HA. Se observaron dos manchas en tiempo 0 que luego del estímulo con glucosa sufrieron un cambio en la motilidad hacia el lado de pH más ácido del gel, indicando un posible cambio en el patrón de fosforilación (Fig. 3B).

Como conclusión de los resultados obtenidos, la falta de cambio en la motilidad de *tpk1^{wt}* en la cepa *tpk1^{wt}* + Tpk1-GFP-HA (Fig. 3A) sumado al cambio observado en Tpk1-GFP-HA en el gel bidimensional (Fig. 3B), estarían de acuerdo con un mecanismo de fosforilación intramolecular en Tpk1 dependiente la actividad de Tpk1 y no intermolecular.

El cambio observado en el gel 2D de la proteína Tpk1-GFP-HA ya es por sí mismo un dato que indica que hubo activación de la vía cAMP-PKA mediada por el pulso de glucosa en esta cepa. Sin embargo para corroborar la activación de dicha vía en esta y las otras cepas de la Tabla 2, llevamos a cabo la determinación de fenotipos controlados por PKA y actividad PKA *in situ* utilizando células permeabilizadas luego del estímulo con glucosa a células creciendo en fuente de carbono no fermentable. Estos experimentos nos permiten comprobar que *tpk1^{wt}* no cambió su motilidad en los geles de la Fig.3 debido a su falta de actividad y no debido a una falta de activación de la vía de cAMP-PKA.

La cepa *tpk1^{wt}* como consecuencia de una reducida actividad catalítica, almacena altos niveles de trehalosa y glucógeno respecto de una célula salvaje (Fig. 4A y 4B); observándose además la acumulación de ambos carbohidratos durante el crecimiento celular respecto de la movilización presentada por la cepa WT como consecuencia de la activación de la PKA por la glucosa.

La complementación de la actividad quinasa por la transformación de la cepa *tpk1^{wt}* con las versiones activas de Tpk2, Tpk1-GFP-HA o Tpk3 revirtieron los efectos dependientes de PKA sobre los niveles de trehalosa que presentaba la cepa *tpk1^{wt}* (Fig. 4 A, tiempo 360 min.).

Respecto de los niveles de glucógeno se observó que la complementación con versiones activas de Tpk (excepto Tpk3) contrarrestó la acumulación del carbohidrato presentada por la cepa *tpk1^{wt}*, indicando que se produjo la movilización de este carbohidrato por el estímulo con glucosa (Fig. 4 B). Cabe aclarar que todas las cepas utilizadas mostraron la misma tasa de crecimiento durante los períodos de tiempo analizados por lo que la acumulación de glucógeno

en las cepas *tpk1^{w1}* y la complementada con Tpk3 se debió a la falta de actividad PKA y no a diferencias en el crecimiento (resultado no mostrado).

El incremento de los niveles de glucógeno observado en la cepa *tpk1^{w1}* + Tpk3 podría deberse a que la actividad Tpk3 no es suficiente para afectar los niveles de glucógeno, consistente con resultados previos que describen la actividad quinasa indetectable en cepas conteniendo sólo TPK3 (Mazón *et al.* 1993). En este sentido, la determinación de actividad *in situ* de PKA en las células complementadas con Tpk3 resultó similar a la cepa *tpk1^{w1}* (resultado no mostrado y Fig. 4C ■).

La actividad *in situ* de PKA en células permeabilizadas durante el estímulo con glucosa no fue detectable en la cepa *tpk1^{w1}* mientras que las cepas complementadas con Tpk2 o Tpk1-GFP-HA sí mostraron activación cuando recibieron el estímulo (Fig. 4C).

Otra observación que se desprende de estos resultados surge de la comparación entre las cepas *tpk1^{w1}* + Tpk2 (Fig. 4C) y la cepa *tpk1^dTPK2TPK3* (Fig. 2C). Asumiendo que en esta última cepa sólo es Tpk2 quien aporta la mayoría de actividad catalítica, se observan diferencias tanto en los niveles de activación de PKA alcanzados por el estímulo con glucosa como en los efectos sobre ambos fenotipos analizados. La cepa *tpk1^{w1}* + Tpk2 respondió al estímulo con glucosa tanto con menor actividad PKA como menor movilización de carbohidratos respecto a la cepa *tpk1^dTPK2TPK3*. Esto es interpretado como consecuencia de un efecto dominante negativo de la versión *tpk1^{w1}* sobre la fosforilación de sustratos a consecuencia de la presencia de moléculas catalíticamente inactivas y activas que no se presenta con la versión *tpk1^d*.

Hasta ahora hemos visto que el cambio de fosforilación de Tpk1 depende de la actividad catalítica y su activación post estímulo con glucosa. Es importante aclarar que en ambos abordajes, *tpk1^d* y *tpk1^{w1}*+TPK2 o *tpk1^{w1}*+TPK1-GFP-HA, obtuvimos menos actividad quinasa respecto a una cepa salvaje. Varias evidencias indican que no se necesita superar un umbral de actividad PKA mediante la activación de la vía cAMP-PKA para que se produzca el cambio en el estado de fosforilación de Tpk1. Primero, una cepa TPK1BCY1, la cual posee el 50% de actividad respecto de una salvaje presentó cambios en la fosforilación de Tpk1 inducida por glucosa (Portela y Moreno, 2005). Segundo, la cepa *tpk1^{w1}*+Tpk1-GFP-HA fue la cepa con menor nivel de actividad quinasa evocada por glucosa (Fig. 4C) pero presentó cambios en el patrón de fosforilación de la molécula Tpk1 activa (Fig. 3B).

Estos resultados, tanto el análisis de los fenotipos como los la actividad PKA *in situ*, indican que en las cepas transformadas la vía de cAMP es activada ante el estímulo con glucosa. De esta forma podemos afirmar que la falta de cambio en el patrón de motilidad de la proteína *tpk1^{w1}* observada en los geles PAGE nativos se deben a la incapacidad de ser fosforilada tanto por Tpk2 como por Tpk3 (coincidentalmente con los resultados mostrados en la Fig. 1) ó Tpk1-GFP-HA.

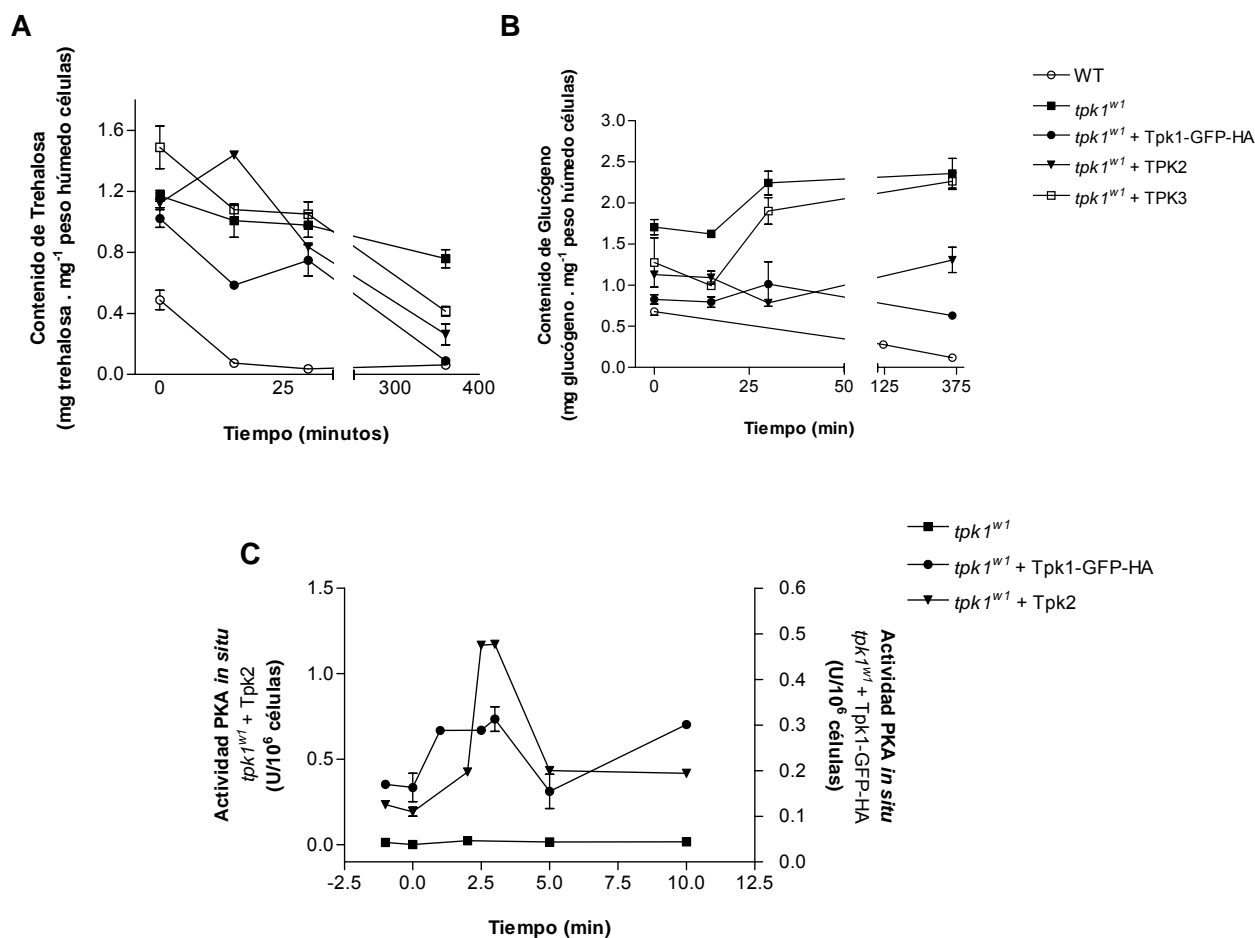


Figura 4 – Activación de la vía PKA mediada por glucosa. Para todos los experimentos, células de la cepa *tpk1*^{w1} Tpk2Δ Tpk3Δ + Tpk1-GFP-HA, + Tpk2 o + Tpk3 fueron crecidas hasta fase exponencial en SDGII 2%. El estímulo con glucosa 100 mM fue realizado en el tiempo 0, que representa una muestra tomada inmediatamente antes de dicho estímulo. *Determinación de Trehalosa (A) y Glucógeno (B)* A los tiempos indicados, las células fueron recolectadas por filtración, lavadas con agua fría y congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Las determinaciones de trehalosa y glucógeno fueron realizados por extracción y dosados como glucosa luego del tratamiento con trehalasa y amiloglucosidasa respectivamente. *(C) Determinación de actividad PKA in situ.* A los tiempos indicados, células fueron cosechadas en agua fría, centrifugadas y permeabilizadas en Tolueno: Etanol (1:4). Las mismas fueron utilizadas en un ensayo de actividad de PKA con el agregado de cAMP (10 μM) exógeno y utilizando kemptido como sustrato + ATP γ [³²P] como se describe en materiales y métodos.

La fosforilación observada en la proteína Tpk1-GFP-HA (Fig. 3B) concuerda con un mecanismo intramolecular de fosforilación, donde sólo presentan cambios en su estado de fosforilación post estímulo con glucosa las moléculas activas de Tpk1 y éstas no son capaces de fosforilar otras moléculas de la isoforma Tpk1. Este resultado también minimiza la posibilidad de participación una quinasa heteróloga, ya que deberíamos haber visto la modificación de las moléculas *tpk1*^{w1} por activación de una potencial quinasa de PKA cuando se activa la vía de cAMP-PKA mediado por glucosa.

Análisis de fosforilación de Tpk2 y Tpk3

Análisis previos de Tpk1 por electroforesis bidimensional mostraron la presencia de 6 isoformas de fosforilación de la proteína (Levin *et al.* 1990). El grado de fosforilación de Tpk1 es mayor cuando las células están creciendo con glucosa como fuente de carbono y estas fosforilaciones aumentan la afinidad por el sustrato (Portela y Moreno 2005). La presencia de diversas isoformas de fosforilación en estas proteínas podría ser un mecanismo de regulación de la PKA en la célula, aparte del mecanismo clásico mediado por la subunidad R. Dado que dichos cambios nunca fueron descritos para los otros alelos de PKA, Tpk2 y Tpk3, nosotros estábamos interesados en estudiar si estas dos proteínas también sufren algún tipo de modificación postraducciona similar. Para analizar estas modificaciones en los alelos Tpk2 y Tpk3, y dado que no existen anticuerpos disponibles comercialmente para dichas proteínas, utilizamos cepas en las cuales cada alelo de PKA está fusionado al epítoto TAP (Tandem Affinity Purification). De esta forma extractos crudos obtenidos antes y después del estímulo con glucosa en dichas cepas fueron analizados en geles bidimensionales, transferidas a nitrocelulosa y revelados con α -TAP. En geles 2D los estados con mayor grado de fosforilación de una proteína se observan como manchas con mayor movilidad hacia el ánodo sobre la misma línea de peso molecular debido a la ganancia de cargas negativas.

Nuestros resultados, al igual que los publicados anteriormente, también indican la presencia de al menos 6 isoformas distintas de Tpk1 las cuales podrían corresponder a distintos estados de fosforilación (Fig. 5A t0, flechas grises). Ante el estímulo de glucosa, se observa un desplazamiento de isoformas hacia el lado de pH más ácido del gel que sólo se resuelve en tres manchas y sería coincidente con mayor grado de fosforilación (Fig. 5A t5, flechas negras).

Cuando analizamos el comportamiento de la isoforma Tpk2, esta mostró un patrón de motilidad diferente al de Tpk1. Una mancha central se observa tanto antes como después del estímulo con glucosa (Fig. 5B, t0 y t5, flecha gris). Sólo cambios menores, con la aparición de dos manchas hacia el lado más ácido y una hacia el más alcalino se observan luego del estímulo con glucosa (Fig. 5B, t5, flechas negras). Comparando los patrones de Tpk1 y Tpk2 podría decirse que Tpk2 no sufre cambios en su patrón de fosforilación de la misma forma en que lo hace Tpk1.

El patrón observado para Tpk3 tiene más similitud con el de Tpk1 en cuanto a la cantidad de manchas que tiene previo al estímulo con glucosa (Fig. 5C t0, flechas grises). Este gel posee cuatro manchas que sufren un cambio de motilidad hacia una sola mancha en el lado más ácido del gel cuando las células son estimuladas con glucosa, lo que sería coincidente con ganancia de fosfatos (Fig. 5C t5, flechas negras).

Para verificar la activación de la vía de PKA en estos experimentos, analizamos el cambio en el patrón de fosforilación de un sustrato fisiológico de PKA como es el factor de transcripción Msn2. Msn2 regula positivamente la expresión de genes de estrés como HSP12 y SSA3.

Cuando células creciendo en medio no fermentable son estimuladas con glucosa hay una activación de la vía de cAMP–PKA. La PKA produce la fosforilación de Msn2 y Msn4 (Görner *et al.* 1998, Jacquet *et al.* 2003). Dicha fosforilación se produce a nivel de la señal de localización nuclear de Msn2 que lo relocaliza en citoplasma (Görner *et al.* 2002).

El análisis del estado de fosforilación de Msn2 se realizó empleando la mismas membranas mostradas en la Fig. 5, las cuales fueron lavadas y reveladas inmunológicamente con α -Msn2 (Materiales y Métodos 13). El estímulo con glucosa mostró un cambio del patrón de motilidad de Msn2 hacia el lado de pH más ácido del gel indicando que hubo activación de la vía de cAMP-PKA en las cepas Tpk1-TAP, Tpk2-TAP y Tpk3-TAP (resultados no mostrados). Esto es importante principalmente para la cepa Tpk2-TAP ya que Tpk2 no presentó cambios de importancia en su patrón de motilidad a pesar que el análisis del estado de fosforilación de Msn2 indicó que se produjo activación de la vía cAMP-PKA inducida por glucosa.

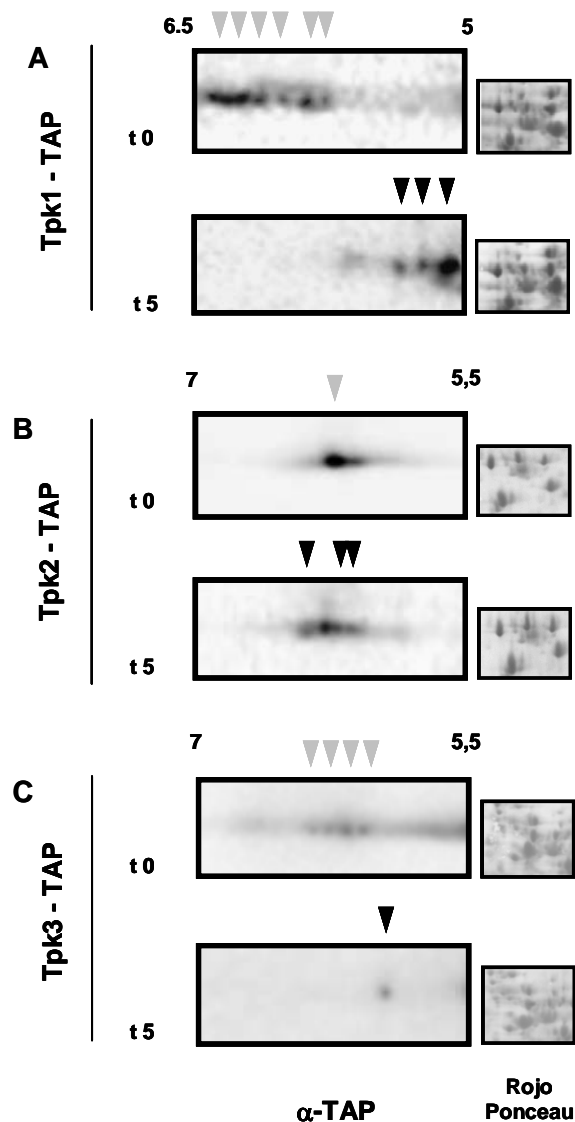


Figura 5 - Patrones de fosforilación de Tpk1 (A), Tpk2 (B) y Tpk3 (C) observados mediante 2D-PAGE. Células de cepas con el epítotope TAP para cada una de las subunidades catalíticas fueron crecidas en YPGli 2% hasta fase exponencial. Extractos crudos de las mismas fueron preparados antes (t0) y después (t5) del estímulo con glucosa 100 mM, y tratados como se indica en materiales y métodos. Los mismos fueron analizados mediante electroforesis bidimensional transferidos a nitrocelulosa y revelados con α -TAP. El control de activación de la vía de PKA en los experimentos se realizó mediante el lavado y posterior revelado de la membrana con α -Msn2. Las flechas grises y negras indican los manchas observados a t0 y t5 respectivamente. Controles de carga de proteína se observan mediante tinción con Rojo Ponceau de las membranas transferidas previamente a su revelado inmunológico.

Los patrones de movilidad electroforética para Tpk2 y Tpk3 observados mediante 2D-PAGE permiten realizar las siguientes conclusiones. Tpk1 y Tpk3 pueden estar sujetas a modificaciones postraduccionales por fosforilación debido a la semejanza del patrón de los geles. Dado que el patrón de Tpk2 no sufre modificaciones substanciales luego del estímulo con glucosa y son distintos a los observados para Tpk1, esta isoforma no estaría sujeta al mismo tipo de modificaciones postraduccionales por fosforilación

Estudio de posibles sitios fosforilados en Tpk1

El análisis electroforético bidimensional de Tpk1 indica que esta proteína está sujeta a varias modificaciones pos-traduccionales, algunas de ellas producto de la fosforilación en múltiples residuos serinas (Levin y Zoller, 1990). A excepción de la Thr²⁴¹, los aminoácidos fosforilados restantes no han sido aún identificados.

Se ha demostrado que la fosforilación de la Thr²⁴¹ es estable ya que fue identificada como fosfo-Thr²⁴¹ en la subunidad Tpk1 cristalizada (Mashhoon *et al.* 2001). Este aminoácido es análogo a la Thr¹⁹⁷ presente en el loop catalítico de C de mamíferos. La mutación por alanina de la Thr²⁴¹ afecta la actividad catalítica y particularmente la interacción con la subunidad reguladora, ya que la mutación disminuye la afinidad 30 veces en la mutante (Moore *et al.* 2002; Levin y Zoller, 1990).

La especificidad de sustrato de las proteínas quinasas está determinada por la naturaleza química del sitio de fosforilación y por la estructura primaria de la proteína en el contexto de este sitio, definido en conjunto como secuencia consenso. La PKA posee un sitio consenso RRXS/T con una preferencia a fosforilar residuos Ser sobre Thr. Estos residuos se encuentran en la superficie de la proteína en un 70% de los casos (Kreegipuu *et al.* 1998). Esto se debe a que las estructuras secundaria y terciaria de la proteína sustrato también tienen influencia sobre la fosforilación de los residuos. Por ejemplo, la exposición de los residuos puede disminuir la eficiencia como sustrato en el contexto de la proteína respecto de un péptido (Portela *et al.* 2006). Estos resultados son producto de análisis realizados sobre sustratos de PKA fisiológicos o péptidos sintéticos, es decir que intervienen en reacciones con mecanismos intermoleculares.

El uso de estos criterios, definidos para reacciones intermoleculares, para la determinación de sustratos intramoleculares, difiere principalmente en que en este tipo de reacciones la proximidad del residuo fosfoceptor puede superar las otras características que se requieren para ser sustrato, incluso su secuencia primaria (Kennelly y Krebs 1991).

Para la identificación de sitios potencialmente fosforilables en Tpk1 realizamos un análisis *in silico*. La secuencia primaria de Tpk1 posee 22 residuos Ser, de las cuales siete fueron seleccionadas (Tabla 3) para el diseño de péptidos (ver Materiales y Métodos 16 y 18) teniendo en cuenta los siguientes criterios:

1. Sitio de fosforilación con alto score según predicción de Netphos ².
2. Sitio con exposición intermedia o alta al solvente según predicción de PredictProtein.

Tpk1					
Posición	Contexto	Potencial PKAK (Homologo Yeast)	Score (1)	Ubicación c loop (2)	Exposición (3)
22	QGEESQKGE	PKC1	0,995		i
28	KGETSERET	CKA1;CKA2;CDC7;PKC1	0,996		i
37	TATESGNES	YCK1;YCK2;YCK3;CKA1;CKA2;CDC7; MCK1YOL128C;MDS1/RIm11;MRK1	0,991		i
43	NESKSVEKE		0,994		i
179	LLRKSQRFP	PKA;PKC1	0,987	cerca	i
322	TRDLSQRLG	CMK2/02325/YOL016C;CMK1;RCK1;R CK2;PKA;PKC1	0,984		e
370	QGDTSQFDK	CKA1;CKA2;CDC7	0,991	cerca	e

(1) Según NetPhos, (2) Según estudios estructurales con el programa RasMol a partir del cristal Tpk1 (delección N terminal), (3) Según PredictProtein

Tabla 3 – Análisis *in silico* de Tpk1, Tpk2 y Tpk3. Los péptidos fueron seleccionados como sustrato para análisis de PKA *in vitro*. Los criterios de selección fueron alto score de fosforilación (> 0.9) según NetPhos, exposición al solvente intermedia (i) o alta (e). Los péptidos resaltados en gris representan los residuos conservados en al menos 2 de las isoformas de PKA. La secuencia del péptido tiene resaltado en negrita el sitio fosfoaceptor.

De los siete residuos de Ser seleccionados, sólo S¹⁷⁹ y S³²² son posibles sustratos de PKA según la secuencia consenso establecida en trabajos previos (Shabb 2001) y el análisis mediante NetPhosP. La S¹⁷⁹ está conservada en las tres isoformas de Tpk mientras que la S³²² está conservada en Tpk1 y Tpk3 pero no en Tpk2. Otra Ser conservada en las tres isoformas es la S³⁷⁰ pero esta no es sustrato de PKA según su secuencia consenso.

A pesar de que los cinco péptidos restantes no poseen la secuencia consenso de PKA, todos fueron ensayados como sustratos en experimentos utilizando tres fuentes distintas de quinasa. Esto se debe a que, como ya mencionamos, los determinantes de especificidad de una reacción intramolecular como la que planteamos para Tpk1 según nuestros resultados, pueden diferir de los intermoleculares.

Para los ensayos de los péptidos seleccionados como sustratos de PKA utilizamos: Tpk1-TAP purificada, Subunidad C de corazón bovino y células permeabilizadas de una cepa Tpk1 *bcy1Δ* para determinación de actividad PKA *in situ*. Esta cepa tiene actividad PKA desregulada e independiente de cAMP debido a la ausencia de la subunidad R.

² Para una descripción de los programas y bases de datos utilizados ver materiales y métodos 18

El péptido conteniendo la S¹⁷⁹ fue el único que resultó comportarse como un sustrato para los tres ensayos (Fig. 6). La eficiencia de este péptido como sustrato, sin embargo, resultó ser mucho menor a la obtenida para el Kemptido. Esto resulta de la comparación de las concentraciones de péptido utilizadas (de 0.1, 0.3 y 1 mM) respecto de la de Kemptido (300 μ M como máximo) y de las actividades obtenidas.

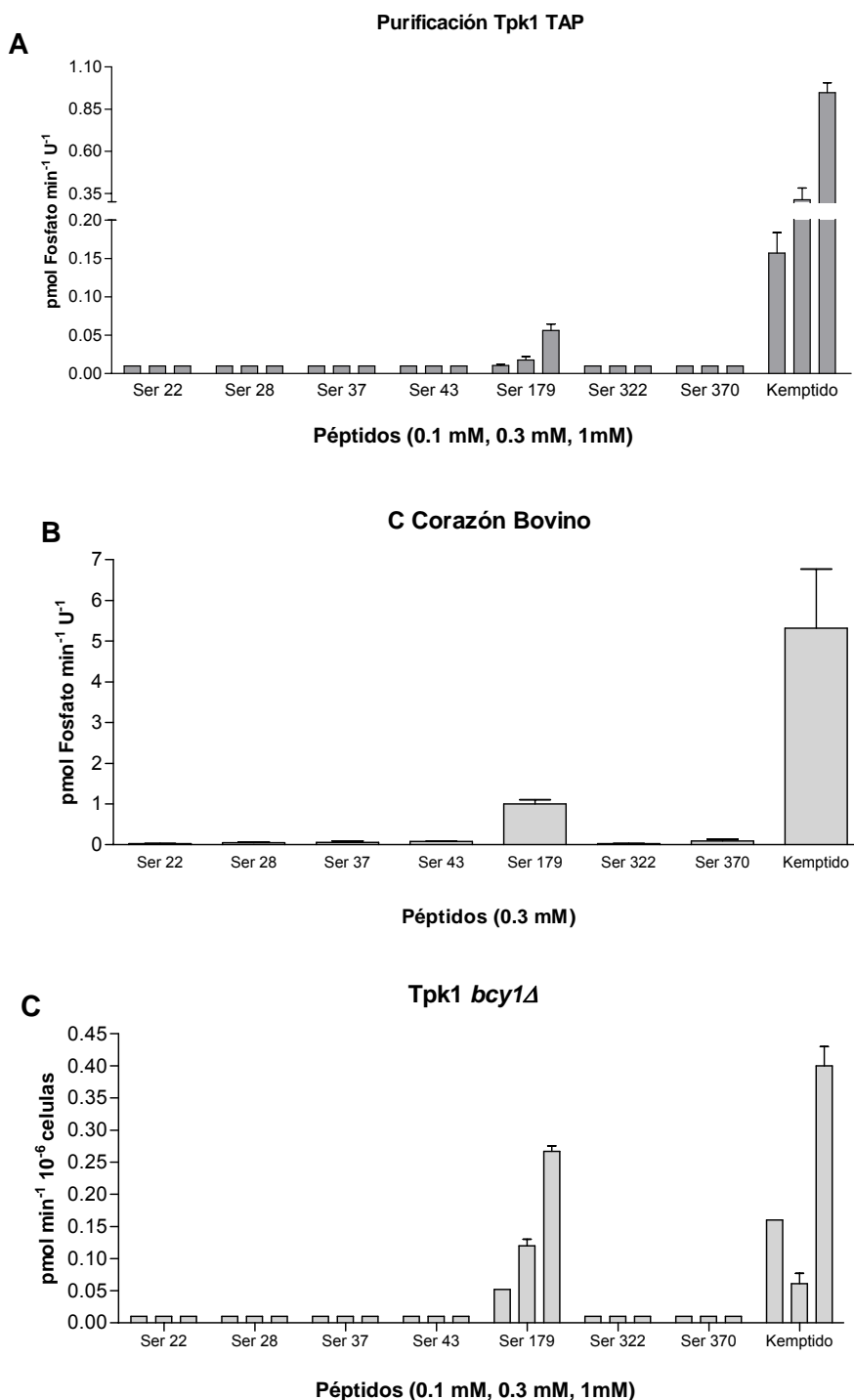


Figura 6 – Ensayo de péptidos derivados del análisis in silico de Tpk1. Los péptidos fueron ensayados con tres fuentes distintas de PKA, Tpk1-TAP purificada (**A**), C Corazón Bovino (**B**), células permeabilizadas de la cepa Tpk1 *bcy1*Δ (**C**). Tres cantidades de péptidos (0.1mM, 0.3 mM y 1mM) se utilizaron para el ensayo con Tpk1-TAP y con las células Tpk1 *bcy1*Δ, mientras que una sola (0.3mM) fue utilizada para la C de Corazón. El Kemptido fue utilizado como control positivo de fosforilación. Para (**A**) y (**C**) fue utilizado a las concentraciones 20, 50 y 200 μ M. Para (**B**) se lo utilizó 300 μ M. Los detalles de los ensayos se describen en materiales y métodos.

Discusión

Tpk1 modifica su estado de fosforilación cuando células creciendo en fuentes de carbono no fermentables sufren un estímulo de glucosa que activa la vía de cAMP. Dichos cambios son dinámicos y reversibles, mostrando un mayor grado de fosforilación durante la fermentación y un menor grado durante la fase estacionaria o durante la respiración. Se ha demostrado que la fosforilación de Tpk1 aumenta la especificidad hacia el Kemptido y esto se considera como un mecanismo de regulación de la actividad de la C luego de su activación (Portela y Moreno 2005). Sin embargo, el origen de dichas modificaciones no había sido determinado, como así tampoco un análisis de los posibles residuos candidatos a sufrir las fosforilaciones. La única evidencia era el requerimiento de la activación de la vía de cAMP. Tampoco se habían observado previamente si estas modificaciones se presentan en las isoformas Tpk2 y Tpk3. Aquí presentamos varias líneas de evidencia que indican que las fosforilaciones observadas se deben a un evento intramolecular de autofosforilación e identificamos un residuo candidato de dichas modificaciones para Tpk1. También observamos que la isoforma Tpk3 posee un comportamiento similar a Tpk1 en su patrón de 2D cuando recibe un estímulo de glucosa y que la isoforma Tpk2 se comporta de manera diferente.

Primero encontramos que las modificaciones en el estado de fosforilación de Tpk1 eran dependientes de la actividad de Tpk1, ya que cepas sin actividad Tpk1 o mutantes atenuadas eran incapaces de realizar dichos cambios, a diferencia de las versiones salvajes (Fig. 1A y 3A). Además los cambios son independientes de la actividad de Tpk2 o Tpk3 dado que en las cepas utilizadas que poseían estas isoformas y sufrían activación de la vía de cAMP (Fig. 2) no presentan cambios en el estado de fosforilación de Tpk1 sin actividad ante el estímulo con glucosa.

También utilizamos cepas con mutantes atenuadas y actividad no detectable de Tpk1 (*tpk1^{w1}*) y carente de actividad Tpk2 ó Tpk3. Cuando dichas cepas fueron transformadas con versiones activas de Tpk1 (Tpk1-GFP-HA), Tpk2 ó Tpk3, la versión *tpk1^{w1}* no mostró cambios en el patrón de fosforilación y la versión activa si modificó su motilidad (Fig. 3B). Estos resultados son concordantes con un mecanismo intramolecular de autofosforilación, dado que si fuese intermolecular las versiones inactivas deberían haberse fosforilado por las activas. Coincidentemente con nuestros resultados, un análisis global de fosforilación de proteínas en *S. cerevisiae* mediante el uso de una tecnología basada en chips proteómicos reveló que Tpk1 es capaz de sufrir eventos de autofosforilación mientras que Tpk2 y Tpk3 no podrían hacerlo, ni fosforilar a Tpk1 (Ptacek *et al.* 2005).

Los dos abordajes realizados sugieren fuertemente que la fosforilación está catalizada por la misma molécula, pero no son definitivos dado que puede discutirse si la mutación que torna a Tpk1 inactiva o atenúa su actividad (Lys¹¹⁶ y *tpk1^{w1}* respectivamente) alteran la conformación

de la proteína de tal forma que impedirían los cambios mediados por otras quinasas. En este sentido, estudios recientes con mutantes Lys⁷² en subunidad C de mamíferos demuestran que esta proteína se une a la subunidad R cuando se encuentra fosforilada en Thr¹⁹⁷ al igual que la proteína normal, y también conserva su capacidad de unir ATP. Además, la mutante Lys⁷² puede ser fosforilada por PDK1 en Thr¹⁹⁷ indicando que sigue siendo reconocida como sustrato (Iyer *et al.* 2005).

Tampoco puede dejarse de lado la existencia, dado que es muy difícil la exclusión, de otra quinasa distinta a Tpk1 que pueda fosforilarla. La demostración de que Tpk1 purificada *in vitro* es capaz de catalizar la autofosforilación sería una prueba que demostraría claramente que el mecanismo es el propuesto.

Para evaluar si los cambios también se manifiestan en las isoformas Tpk2 y Tpk3, las mismas fueron analizadas mediante electroforesis bidimensional antes y después del estímulo con glucosa en células creciendo en medio no fermentable y con dichas proteínas marcadas con el epítipo TAP. La comparación de los patrones indica que Tpk1 y Tpk3 presentan modificaciones similares luego del estímulo con glucosa (Fig. 5A y 5C). Los resultados de Tpk2 no presentan un cambio significativo luego del estímulo con glucosa indicando que no está sujeta al mismo tipo de modificaciones por fosforilación (Fig. 5B). Una posible explicación para esto es que tal vez Tpk2 no esté sujeta a los mismos mecanismos regulatorios postraduccionales que especulamos para Tpk1. Los cambios en el patrón de motilidad de Tpk1 en geles nativos se deben a cambios en estados de fosforilación como se comprobó mediante el uso de fosfatasa alcalina (Fig. 1). A pesar de estas evidencias, se deben realizar experimentos con fosfatasa alcalina y analizar los patrones 2D para corroborar que las diferentes manchas observadas con este abordaje se deben al mismo tipo de modificación postraduccionales.

Basados en análisis *in silico* de Tpk1 se realizó el diseño de péptidos con el fin de poder identificar *in vitro* los posibles residuos Ser que sufren fosforilación en la proteína. Mediante el uso de diversos programas y bases de datos se seleccionaron siete péptidos basándose en su secuencia consenso para fosforilación por una quinasa y exposición a solvente.

Un análisis de la distribución de los residuos en la secuencia primaria muestra Tpk1 y Tpk3 muestran 4 y 5 residuos con score de fosforilación mayor a 0.9 en los 80 aminoácidos N Terminales. En contraparte, dicho extremo en la isoforma Tpk2 no posee ninguna Ser con score mayor a 0.9 (Fig. 7). De este análisis surge que Tpk1 y Tpk3 poseen similitud en número y distribución de sitios fosforilables. Además, Tpk2 presenta un análisis distinto al de las otras isoformas, con menor cantidad de sitios fosforilables. Esto concuerda con los patrones de geles 2D en los que las isoformas Tpk1 y Tpk3, con mayores variaciones en su motilidad luego del estímulo con glucosa, son las que poseen mayor cantidad de sitios de fosforilación *in silico* determinados según nuestros criterios.

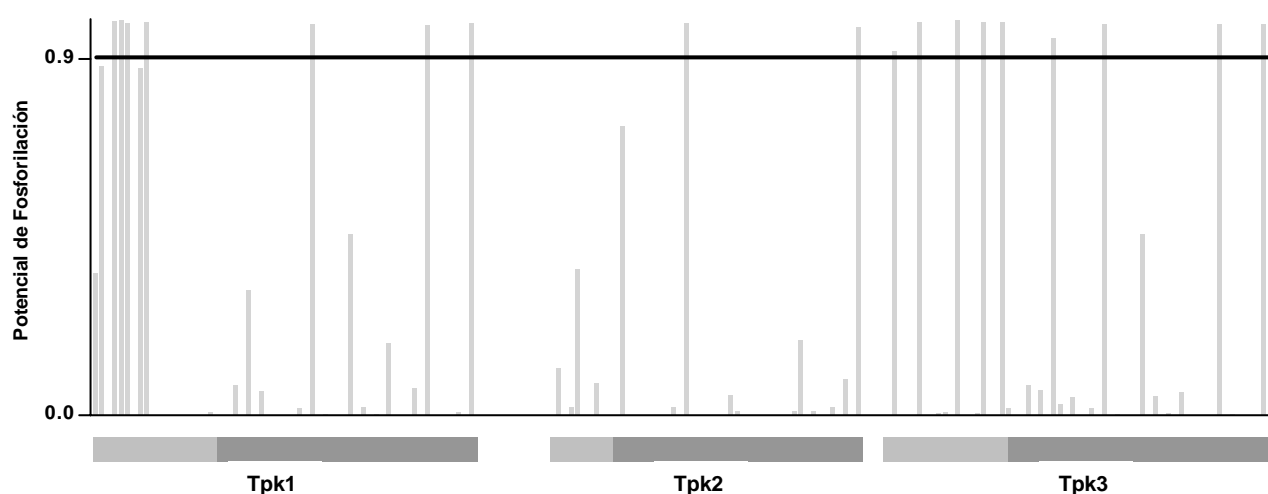


Figura 7 – Distribución de los residuos en la secuencia primaria. En toda la secuencia los residuos con Score > 0.9 son 7 para Tpk1, 9 para Tpk3 y 2 para Tpk2. Tpk1 posee 4 de esos residuos en el extremo N Terminal, mientras que Tpk3 posee 5 y Tpk2 ninguno. Los dos residuos de Tpk2 con Score > 0.9 se encuentran conservados en las otras dos isoformas y son la S¹⁷⁹ y S³⁷¹ de Tpk1. Las barras inferiores indican los primeros 80 residuos en gris claro.

Los resultados de ensayos *in vitro* de PKA utilizando los péptidos indican que sólo la Ser¹⁷⁹ resultó fosforilada utilizando tres tipos diferentes de fuente de quinasa, Tpk1-TAP purificada, subunidad catalítica comercial y células permeabilizadas, y siempre con una eficiencia de fosforilación inferior a la obtenida para el Kemptido. Los péptidos sintéticos han sido usados para estudiar determinantes de proteínas quinasas e incluso las secuencias consenso de dichas enzimas. Sin embargo, los análisis estadísticos de sitios de fosforilación conocidos en proteínas revelaron que muchos de estos sitios no contienen la secuencia consenso completa (Barsony and Marks 1990). Trabajos recientes indican que alteraciones en la estructura de aminoácidos alrededor de la Ser fosforilable tienen mucha más influencia en péptidos que en proteínas como sustratos (Loog *et al.* 2005). Dicho de otra forma, la importancia de los factores determinantes de especificidad es menor para proteínas que para péptidos. Además todos estos estudios se han realizado teniendo en cuenta los factores determinantes de especificidad en caso de reacciones de fosforilación intermoleculares (y ninguno en reacciones intramoleculares) y se ha sugerido que los determinantes intramoleculares difieren no solamente en las secuencias consenso sino además en el aminoácido a ser fosforilado. Por ejemplo, la autofosforilación de la Serina/Treonina Quinasa GSK3 β es intramolecular y en un residuo Tyr cuya secuencia consenso difiere de sitio común de fosforilación de la enzima (Cole *et al.* 2004). Es decir, los resultados negativos utilizando péptidos *in vitro*, y por lo tanto que intervienen fuera del contexto proteico y en una reacción intermolecular, no descartan que dichos residuos sean fosforilables cuando se hallan en la estructura de la proteína y en un mecanismo intramolecular.

Conclusiones generales

Cuando células creciendo en un medio con fuente de carbono no fermentable son estimuladas por glucosa, Tpk1 sufre un aumento en su estado de fosforilación. El mecanismo molecular de fosforilación de Tpk1 es de tipo intramolecular. La fosforilación luego del estímulo estaría asociada a un mecanismo de regulación, alterando la afinidad por el sustrato.

La isoforma Tpk3 posee un cambio en el patrón de motilidad en geles 2D post estímulo con glucosa similar a Tpk1, indicando también un posible mecanismo de regulación por fosforilación. La isoforma Tpk2 no presenta este tipo de patrón por lo que suponemos que la misma no estaría regulada por este mecanismo.

Las modificaciones postraduccionales desencadenadas por la glucosa parecerían diferentes para cada isoforma de Tpk. Esto aportaría un mecanismo regulatorio diferencial sobre las actividades catalíticas, interacción con Bcy1 o localización subcelular de cada isoforma aportando especificidad de función por parte de Tpk1, Tpk2 y Tpk3.

Según el análisis *in silico* y el uso de péptidos derivados de Tpk1 como sustratos en ensayos quinasa *in vitro*, un residuo candidato a sufrir fosforilación en Tpk1 es la Ser¹⁷⁹.

En la Figura 8 proponemos un modelo para la fosforilación de las isoformas de PKA durante la transición del metabolismo respiratorio al fermentativo.

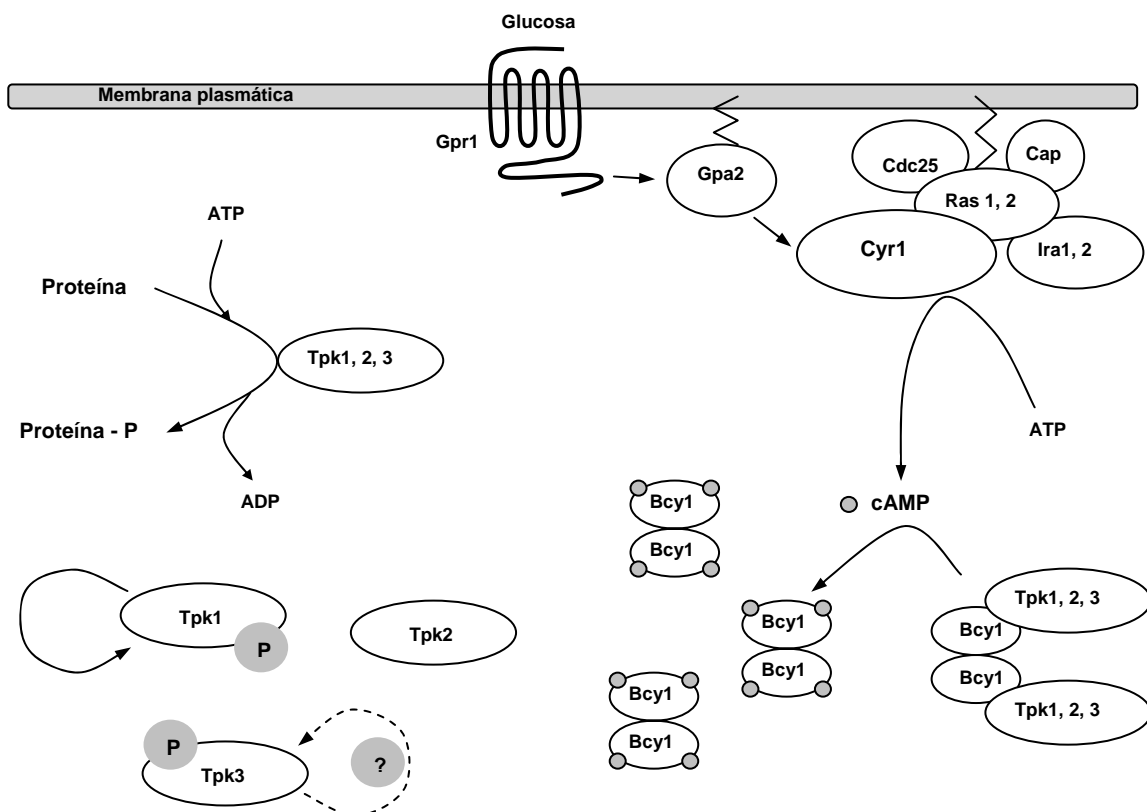


Figura 8 – Mecanismo propuesto de fosforilación de Tpk1. Cuando células crecidas en fuente de carbono no fermentable o en fase estacionaria son estimuladas por glucosa se produce el incremento de los niveles de cAMP intracelular. Esto promueve la activación de la PKA, la cual permite la fosforilación de sustratos. El mecanismo propuesto para la fosforilación de Tpk1 es autocatalítico e intramolecular. Tpk3 podría sufrir modificaciones por fosforilación similares, mientras que Tpk2 permanecería sin cambios.

Perspectivas

Los resultados obtenidos sugieren que la activación de la vía de cAMP mediada por glucosa en células creciendo en medio no fermentable o en fase estacionaria provoca la fosforilación de Tpk1 por un mecanismo autocatalítico e intramolecular. Sin embargo se podrían realizar experimentos para reforzar esto.

Las reacciones de fosforilación intramoleculares poseen características distintivas que permiten reconocerlas frente a las intermoleculares. Las reacciones intramoleculares poseen una cinética independiente de la cantidad de proteína, mientras que en las intermoleculares el agregado de más enzima provoca un incremento en la tasa de fosforilación ya que dependen de colisiones bimoleculares. Otra característica de las reacciones intramoleculares es que no son dependientes de la temperatura ya que, como mencionamos anteriormente, no dependen de las colisiones moleculares. Por ejemplo, se debería obtener la misma tasa de fosforilación a 4°C que a 30°C. Estos ensayos podrían realizarse in vitro con Tpk1 purificada.

A pesar de que las evidencias indican que las modificaciones de Tpk1 se deben a fosforilaciones, esto debe ser verificado empleando geles bidimensionales. Esto podría comprobarse mediante el uso de fosfatasa alcalina para lograr la defosforilación de la proteína.

La utilización de péptidos derivados de Tpk1 es sólo un abordaje para la identificación de posibles sitios de fosforilación. El siguiente paso es el mapeo de los sitios de fosforilación de Tpk1 y de las otras isoformas mediante técnicas de espectrometría de masa (MS) como MALDI (**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onization) o ESI (**E**lectrospray **I**onization) sobre preparaciones purificadas Tpk1-TAP. Este abordaje ya está en curso y se tienen algunos resultados preliminares.

Una vez identificados, se podrán construir mutantes de Tpk1, Tpk2 o Tpk3 en dichos residuos con el fin de caracterizar la importancia de las modificaciones en las propiedades cinéticas de las mutantes como así también el impacto que tienen en la fisiología de la célula. El abordaje utilizado en esta tesis de utilización de péptidos para identificar el sitio de fosforilación condujo a la mutación puntual de la Serina 179 por Alanina en la copia cromosómica de Tpk1.

Materiales y Métodos

1. Cepas de levaduras.

Cepa	Genotipo
<i>W303 – 1^a</i>	<i>Mata leu2-3 his3-11 trp1-1 ade2-1 can1-100 ura3-1 GAL SUC</i>
<i>YMR 60</i>	<i>W303 1a Mata tpk1::URA3</i>
<i>YMR 60 + Tpk1</i>	<i>W303 1a Mata tpk1::URA3 + pTpk1</i>
<i>YMR 60 + tpk1^d</i>	<i>W303 1a Mata tpk1::URA3 + ptpk1^d</i>
<i>S18 - 1D</i>	<i>MATα leu2 ura3 his3 trp1 ade8 tpk1^{w1} tpk2::HIS3 tpk3::TRP1</i>
<i>S18 - 1D + Tpk2</i>	<i>MATα leu2 ura3 his3 trp1 ade8 tpk1^{w1} tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 + pTD46</i>
<i>S18 - 1D + Tpk3</i>	<i>MATα leu2 ura3 his3 trp1 ade8 tpk1^{w1} tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 + pTD49</i>
<i>S18 - 1D + Tpk1-GFP-HA</i>	<i>MATα leu2 ura3 his3 trp1 ade8 tpk1^{w1} tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 + Ycp50-GFP-AGH-Tpk1</i>
<i>S13-3A</i>	<i>Mata his3 leu2 ura3 trp1 his3 ade8 tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 bcy::LEU2</i>
<i>S288C TPK1-TAP</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 tpk1TAP</i>
<i>S288C TPK2-TAP</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 tpk2TAP</i>
<i>S288C TPK3-TAP</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 tpk3TAP</i>

Todas las cepas, excepto las transformadas con plásmidos, fueron cedidas por el Prof. Dr. Johan Thevelein. Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, Department of Molecular Microbiology, K.U. Leuven, Belgium. Las cepas TPK1-TAP, TPK2-TAP, TPK3-TAP fueron adquiridas de Open Biosystems.

2. Plásmidos utilizados

Plásmido	Nomenclatura	Características	Descripción	Fuente o Referencia
pTD45	Tpk1	pRS, CEN, LEU, TPK1 salvaje	Gen TPK1 salvaje	Fox T.
pTD53	tpk1 ^d	pRS, CEN, LEU, TPK1 inactiva	Gen TPK1 con una mutación inactivante en Lys ¹¹⁶ (1)	Fox T.
pTD46	Tpk2	pRS, CEN, LEU, TPK2 salvaje	Gen TPK2 salvaje	Fox T.
pTD49	Tpk3	pRS, CEN, LEU, TPK3 salvaje	Gen TPK3 salvaje	Fox T.
Ycp50-GFP-AGH-TPK1	Tpk1-GFP-HA	Ycp50, CEN, Promotor débil ADH	Gen TPK1 fusionado a GFP y HA	Thevelein J.

CEN – Plásmidos centroméricos, bajo número de copias. **ADH** Alcohol Deshidrogenasa (1) Ver introducción general descripción de subunidad catalítica

Los plásmidos fueron cedidos por el laboratorio del Prof. Dr. Thomas Fox, Cornell University, Molecular Biology & Genetics. Ithaca, USA. Excepto *Ycp50-GFP-AGH-TPK1* que fue provisto por el Dr. J. Thevelein.

3. Transformación de levaduras. Las células fueron transformadas por el método de Acetato de Litio (Ito *et al.*, 1983).

4. Medios y condiciones de crecimiento. El medio de levaduras fue preparado como describe Sherman *et al.* (1981). Las cepas fueron crecidas sobre medio rico: 2% de Bactopeptona, 1% de extracto de levaduras y 2% de glucosa (YPglu) ó 2% de glicerol (YPgli). El medio sintético contiene 0.67% de base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos, 2% de glucosa (SDglu) ó 2% de glicerol (SDgli) mas los aminoácidos necesarios para completar los requerimientos auxotróficos y mantener la selección de los plásmidos. El medio sólido contiene 2% de agar. Las células fueron crecidas en agitador orbital a 30° C en el medio apropiado y las muestras fueron tomadas a diferentes fases de crecimiento o tiempos luego de un tratamiento de acuerdo a los requerimientos experimentales.

5. Determinación del contenido de trehalosa y glucógeno. Las células fueron cosechadas por filtración, lavadas una vez con agua fría, pesadas y congeladas en nitrógeno líquido. Las determinaciones de trehalosa y glucógeno fueron realizadas de acuerdo al protocolo descrito por Colombo *et al.* (1998).

6. Preparación de extracto crudo. Las células de levaduras fueron crecidas hasta una concentración $0.5-1.0 \times 10^7$ células/ml (fase exponencial de crecimiento) en medio apropiado. Las células fueron lisadas por ruptura con bolitas de vidrio a 4° C en 0.5 ml de Tris-HCl 50mM pH 7, EDTA 5mM, EGTA 3mM, 2-mercapto-etanol 10mM, cóctel de inhibidores de fosfatasas compuesto por β -glicerofosfato 5mM, fluoruro de sodio 10mM, ortovanadato de sodio 0.1mM, molibdato de amonio 0.1mM, pirofosfato de sodio 10mM, cóctel de inhibidores de proteasa libre de EDTA. El debris celular fue decantado por centrifugación por 5 min., 5000 $\times g$ a 4° C; y el sobrenadante fue usado inmediatamente para la corrida en geles o para la purificación de la proteína Tpk1-TAP.

7. Purificación de Tpk1-TAP. Las proteínas fueron purificadas de cepas que contienen el ORF fusionado a una etiqueta TAP (Open Biosystems) en posición C terminal. La purificación se realizó mediante el procedimiento standard (Rigaut *et al.* 1999) con dos pasos de purificación/elusión específicos, modificado según Yeast Resource Center Washington University (http://depts.washington.edu/~yeastrc/ms_tap1.htm). La etiqueta TAP consiste en dos dominios de proteína A de unión IgG y un péptido de unión a Calmodulina separados con un sitio de corte de TEV proteasa que permite la purificación secuencial usando IgG Sepharosa 4B y Calmodulina Sepharosa 4B respectivamente. La calidad de la purificación de Tpk1-TAP fue analizada por SDS-PAGE, inmunotransferencia anti-TPK1 y

anti-TAP (ver **Materiales y Métodos 13**) y se determinó la actividad catalítica. Se obtuvo una K_m : 50 μM para el kemptido (resultado no mostrado) comparable a los valores reportados previamente por (Denis *et al.* 1991).

8. Determinación de concentración de proteínas. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método de Bradford con BSA como proteína estándar. (Bradford, 1976)

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

10. Actividad PKA *in situ*. Las células ($1-2 \cdot 10^8$ células) son cosechadas y mezcladas inmediatamente con agua fría. Luego son centrifugadas a 3000xg durante 5 min. a 4°C. El pellet celular es lavado una vez con agua fría y resuspendido en el buffer A. La permeabilización de las células se realizó como se describe en **Materiales y Métodos 9**.

El ensayo de PKA en células permeabilizadas fue realizado por incubación de las muestras con $1.2-2.4 \times 10^6$ células en un volumen final de 70 μl por 3 min. a 30° C en la mezcla de incubación descrita en **Materiales y Métodos 11**. La reacción es finalizada por el agregado de BSA 5 mg/ml y el calentamiento a 100° C durante 1 min. Los ensayos fueron lineales con el tiempo y el número de células.

La actividad de PKA es expresada en unidades (U), donde 1 U es la cantidad de enzima que cataliza la transferencia de 1 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1}$ de fosfato bajo condiciones estándares de ensayo. Los datos obtenidos desde las mediciones de la actividad de PKA *in situ* son expresados en $\text{U} \times 1.10^6$ células; este valor está corregido teniendo en cuenta la viabilidad de las células antes de la permeabilización.

11. Determinación de actividad de la subunidad catalítica de la PKA. La actividad catalítica de la subunidad C se determinó usando diferentes sustratos peptídicos. El ensayo se inició mezclando el sustrato indicado en cada figura con diferentes fuentes de PKA: subunidad catalítica de corazón bovino (Cb, Sigma), Tpk1-TAP semi-purificada, en 50 mM fosfato de potasio pH 7.5, 0.1mM $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1000 d.p.m.pmol⁻¹ DuPont New England

Nuclear), EGTA 0.1mM, EDTA 0.1mM, MgCl₂ 15mM, 2-mercaptoetanol 10 mM y cAMP 10 μM (cuando se indica). El volumen final de la reacción fue 70 μl. Luego de 10 min. a 30° C, las alícuotas fueron procesadas de acuerdo al método de fosfoelulosa (P81; Whatman) descrito por Roskoski (1983). Los ensayos de PKA fueron lineales con el tiempo y la concentración de proteínas. Cb fue reconstituida en ditiotreitol 50 mM y las unidades usadas en los ensayos (pmol de fosfato incorporado a sustrato peptídico sintético por minuto) fueron estimadas de acuerdo a las instrucciones indicadas por el fabricante, excepto cuando es indicado, donde la actividad es determinada bajo las condiciones estándares de ensayo.

12. Electroforesis en poliacrilamida - SDS-PAGE: Muestras de preparaciones proteicas fueron separadas por SDS-PAGE 10%T (Laemmli, 1970). **PAGE nativo:** Los geles fueron preparados básicamente como se realizaron los SDS-PAGE pero se omitió el SDS, y se preparó el gel concentrador utilizando Tris-HCl 0.15 M pH 9.

13. Análisis Inmunológico. Muestras de preparaciones proteicas (indicado en cada figura) fueron separadas por SDS-PAGE o geles nativos, transferidas a membranas de nitrocelulosa (MSI) usando Tris 25 mM, Glicina 192 mM, metanol 20% (v/v), durante 60 min. a 90 volts. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada, 0.05% de Tween 20 en buffer PBS e incubadas con los siguientes anticuerpos: anti-TPK1 (TPK1yC-20, Santa Cruz Biotechnology) 1/200; anti-TAP (Open Biosystems) 1/1000; anti-HA (Santa Cruz Biotechnology) 1/1000, anti-Msn2 (generosamente cedido por el Dr F. Estruch, Universidad de Valencia, España) 1/500; durante 16 h a 4° C. Posteriormente las membranas fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) por 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, las membranas fueron lavadas e incubadas con el reactivo quimioluminiscente Western Lightning (Perkin Elmer). Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas por imagen digital (Bio-Imaging Analyzer Bas-1800II and Image Gauge 3.12 Fujifilm). Para el revelado inmunológico con otro anticuerpo primario sobre la misma membrana se realizó un lavado con una solución de limpieza conteniendo 100mM betamercapto, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH:7 durante 1 hora a 50°C con agitación, lavados con PBS-0,05 % Tween 20 (3x10min) y bloqueo nuevamente.

14. Tratamiento con fosfatasa alcalina de la subunidad catalítica de *S. cerevisiae*.

Se utilizó fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Sigma) para defosforilar la proteína Tpk1p presente en extracto crudo de la cepa *W303*. Con el objetivo de analizar las isoformas de Tpk1p tratadas o no con fosfatasa utilizando PAGE nativo, 80 µg de proteína total fueron incubadas por 15 min. a 37° C en un volumen final de 40 µl conteniendo Tris-HCl 0.1 M pH 9.5, MgCl₂ 50 mM, NaCl 0.1 M, y 100 unidades de fosfatasa alcalina. La reacción fue detenida por el agregado de un cóctel de inhibidores de fosfatasa. Las muestras tratadas o no previamente con fosfatasa alcalina fueron separadas en PAGE nativo, y las isoformas de Tpk1p fueron analizadas inmunológicamente utilizando el anti-TPK1 (**Materiales y Métodos 13**).

15. Validación de resultados. Los valores presentados en las determinaciones bioquímicas son el promedio +/- SEM de al menos dos determinaciones independientes.

16. Péptidos utilizados. La determinación de fosforilación de péptidos fue realizada de acuerdo al método de Roskoski *et al.* (1983) utilizando papel de fosfocelulosa (Whatman). La interacción con el papel de fosfocelulosa (cargado negativamente) requiere que el péptido luego de ser fosforilado tenga al menos una carga neta positiva a pH ácido por lo que, en algunos casos, es necesario el agregado de residuos básicos. En negrita se indica el aminoácido fosfoceptor y subrayado se indica el residuo agregado (que no pertenece a la secuencia primaria de la proteína) Kempérido: LRRT**S**IIGT; Derivados de secuencia Tpk1: S22 RQGE**S**QKGE, S28 KGET**S**ERET, S37 AT**S**GN**S**ESK**K**, S43 NESK**S**VEKE, S179 LLRK**S**QRFP, S322 TRDL**S**QRLG, S370 QGD**S**QFD**K**K

17. Electroforesis bi-dimensional. El extracto crudo de proteína para electroforesis bi-dimensional fue realizado como se describe en **Materiales y Métodos 6**. El mismo fue precipitado con un volumen igual de TCA 20% (v/v) en acetona con 20 mM de DTT e incubado 45 min. a -20°C. Luego de una centrifugación por 15 min. a 15000 xg a 4°C el pellet fue lavado con acetona fría con 20 mM de DTT, incubado 1hr a -20 °C, centrifugado nuevamente y secado. Finalmente se solubilizó en solución de lisis conteniendo Urea 8 M, Nonidet P-40 2% , 20mM DTT, azul de bromofenol y 0.5 % IPG buffer (General Electric Life Sciences) a razón 50 µl buffer/mg pellet seco durante 2-4hs. La solución de lisis contiene. Las muestras fueron usadas inmediatamente o almacenadas a -80 °C hasta su uso. 125 µl (50 µg) de las muestras fueron transferidas a tiras IPG (pH 3–10, 7cm, General Electric Life Sciences) para su hidratación durante 16hs. El isoelectroenfocado se llevó a cabo en el sistema Ettan IPGphor (General Electric Life Sciences) por 2hs a 500V, 1hr 1000V, 1hr a

4000V y 1hr a 8000V. Las tiras fueron luego equilibradas en buffer de equilibrio (Urea 6M, DTT 20 mM, Tris-HCl pH 8.8 50 mM, glicerol 30%, SDS 2% y azul de bromofenol) durante 30 min. y sometidas a la segunda dimensión en SDS-PAGE. Las proteínas fueron transferidas a nitrocelulosa y reveladas con anticuerpos anti-TAP (**Materiales y Métodos 13**).

18. Análisis *in silico* *Ras/Mol* v.2.6 fue utilizado para la localización de los residuos estudiados en la estructura del cristal de Tpk1^{Δ1-80}. *Saccharomyces Genome Database* (<http://db.yeastgenome.org>) fue utilizado en la búsqueda de ORF para los genes de importancia en el trabajo. El servidor del Center For Biological Sequence Análisis, Technical University of Denmark - *NetPhos* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) fue utilizado para realizar las predicciones de sitios de fosforilación de las secuencias de Tpk y *NetPhosK* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) para predicciones de especificidad de quinasas para dichos sitios. El servidor *Scansite* (http://scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml) fue utilizado para la determinación de posibles secuencias consenso de fosforilación por quinasas eucariotas en la secuencia de las isoformas de Tpk. Diversos programas del servidor de proteómica *Expasy* (<http://www.expasy.org/>) fueron utilizados para la determinación de pI y PM. El servidor *Predict Protein* del European Molecular Biology Laboratory (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>) fue utilizado en la predicción de sitios de exposición al solvente de Tpk1.

Bibliografía

1. App H, Holzer H (1989) Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS1 mutant. *J Biol Chem.* 264: 17583-8.
2. Bell W, Sun W, Hohmann S, Wera S, Reinders A, De Virgilio C, Wiemken A, Thevelein JM (1998) Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J Biol Chem.* 273: 33311-9.
3. Boy-Marcotte E, Perrot M, Bussereau F, Boucherie H, Jacquet M (1998) Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 180: 1044-52.
4. Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
5. Cameron S, Levin L, Zoller M, Wigler M (1988) cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism, and heat shock resistance in *S. cerevisiae*. *Cell* 53: 555-66.
6. Casamayor A, Torrance P, Kobayashi T, Thorner J, Alessi DR. (1999) Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr. Biol.* 9: 186- 197
7. Cauthron RD, Carter KB, Liaw S, Steinberg RA (1998) Physiological phosphorylation of protein kinase A at Thr-197 is by a protein kinase A kinase. *Mol Cell Biol* 18: 1416-1423.
8. Cole A, Frame S, Cohen P (2004) Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem. J.* 377: 249-255.
9. Colombo S, Ma P, Cauwenberg L, Winderickx J, Crauwels M, Teunissen A, Nauwelaers D, de Winde HJ, Gorwa M-F, Colavizza D and Thevelein JM (1998) Involvement of distinct G-proteins and RAS, in glucose- and intracellular acidification-induced cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 17: 3326-3341.
10. Demlow CM and Fox TD (2003) Activity of Mitochondrially Synthesized Reporter Proteins Is Lower Than That of Imported Proteins and Is Increased by Lowering cAMP in Glucose-Grown *Saccharomyces cerevisiae* Cells. *Genetics* 165: 961-974
11. de Winde JH, Crauwels M, Hohmann S, Thevelein JM, Winderickx J (1996) Differential requirement of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *Eur J Biochem.* 241: 633-43.
12. Denis CL, Kemp BE and Zoller MJ (1991) Substrate specificities for yeast and mammalian cAMP-dependent protein kinases are similar but not identical. *J Biol Chem* 266: 17932-17935.
13. Diller TC, Madhusudan, Xuong NH, Taylor SS (2001) Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta regulatory subunit. *Structure (Camb).* 9(1): 73-82.
14. Görner W, Durchschlag E, Martínez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, Schüller C (1998) Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2 is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & Dev* 10: 1516-1531.
15. Görner W, Durchschlag E, Wolf J, Brown EL, Ammerer G, Ruis H, Schuller C (2002) Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J.* 21: 135-44.
16. Griffioen G, Anghileri P, Imre E, Baroni MD, Ruis H (2000) Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 275: 1449-1456.
17. Griffioen G, Branduardi P, Ballarini A, Anghileri P, Norbeck J, Baroni MD, Ruis H Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain (2001) *Mol Cell Biol* 21: 511-523.
18. Griffioen G, Swinnen S, Thevelein JM. (2003) Feedback inhibition on cell wall integrity signaling by Zds1 involves Gsk3 phosphorylation of a cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit. *J Biol Chem.* 278(26): 23460-71.
19. Griffioen G, Thevelein JM (2002) Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. *Curr Genet* 41: 199-207.
20. Harashima T and Heitman J (2002). The G α protein Gpa2 controls yeast differentiation by interacting with kelch repeat proteins that mimic G β subunits. *Mol. Cell* 10: 163- 173
21. Harashima T and Heitman J (2005) G α subunit Gpa2 recruits kelch repeat subunits that inhibit receptor-G protein coupling during cAMP-induced dimorphic transitions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol Cell* 16: 4557-4571
22. Humphries K, Deal MS, Taylor SS. (2005). Enhanced dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase by oxidation and thiol modification. *J. Biol Chem* 280: 2750-2758
23. Huse M, Kuriyan J (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.* 109: 275-82.

24. Ito H, Fukuda Y, Murata K & Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153: 163-168. *J Cell Sci.* 114:3255-64.
25. Iyer G, Moore M, Taylor SS (2005). Consequences of lysine72 mutation on the phosphorylation and activation state of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 280: 8800-8807.
26. Iyer G, Garrod S, Woods Jr VL, Taylor SS (2005). Catalytic independent functions of a protein kinase as revealed by a kinase-dead mutant: study of the Lys72His mutant of cAMP-dependent kinase. *J. Mol. Biol.* 351: 1110-1122.
27. Jacquet M, Renault G, Lallet S, De Mey J, Goldbeter A (2003) Oscillatory behavior of the nuclear localization of the transcription factors Msn2 and Msn4 in response to stress in yeast. *ScientificWorldJournal.* 3: 609-12.
28. Johnson LN, Noble ME, Owen DJ (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell.* 85:149-58.
29. Kennelly PJ and Krebs EG (1991) Consensus Sequences as Substrate Specificity Determinants for Protein Kinases and Protein Phosphatases. *J Biol Chem* 266: 15555-15558
30. Kim C, Xuong N, Taylor SS (2005). Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (R1 α) subunits of PKA. *Science* 307: 690-696.
31. Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM (1991) Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science.* 253: 414-20.
32. Kopperud R, Krakstad C, Selheim F, Doskeland SO (2003) cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. *FEBS Lett.* 546: 121-6.
33. Kraakman L, Lemaire K, Ma P, Teunissen AW, Donaton MC, Van Dijck P, Winderickx J, de Winde JH and Thevelein JM (1999) A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol* 32: 1002-1012.
34. Kreegipuu A, Blom N, Brunak S, Jarv J (1998) Statistical analysis of protein kinase specificity determinants. *FEBS Lett.* 430: 45-50. Review.
35. Kuret J, Johnson K, Nicolette C and Zoller MJ (1988) Mutagenesis of the regulatory subunit of yeast cyclic AMP-dependent protein kinase; isolation of site-directed mutants with altered binding affinity for catalytic subunit. *J Biol Chem* 263: 9149-9154.
36. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227: 680-682.
37. Lemaire K, Van de Velde S, Van Dijck P, Thevelein JM (2004) Glucose and sucrose act as agonist and mannose as antagonist ligands of the G protein-coupled receptor Gpr1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell.* 16:293-9.
38. Levin LR, Kuret J, Johnson KE, Powers S, Cameron S, Michaeli T, Wigler M, Zoller J (1988) A Mutation in the Catalytic Subunit of cAMP-Dependent Protein Kinase That Disrupts Regulation. *Science* 240: 68-70
39. Levin L & Zoller MJ (1990) Association of catalytic and regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase requires a negatively charged side group at a conserved threonine. *Mol Cell Biol* 10: 1066-1075.
40. Loog M, Oskolkov N, O'Farrell F, Ek P, Järvi J (2005). Comparison of cAMP-dependent protein kinase substrate specificity in reaction with proteins and synthetic peptides. *Biochem et Biophys acta* 1747: 261-266.
41. Lu A, Hirsch JP (2005). Cyclic AMP-Independent Regulation of Protein Kinase A Substrate Phosphorylation by Kelch Repeat Proteins. *Eukaryotic Cell* 4: 1794-1800.
42. Ma P, Wera S, Van Dijck P, Thevelein JM (1999) The *PDE1* encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signalling. *Mol Cell Biol* 10: 91-104.
43. Ma P, Gonçalves T, Marezek A, Loureiro Dias MC, Thevelein J (1997) The lag phase rather than the exponential growth phase on glucose is associated with a higher cAMP level in wild-type and cAPK attenuated strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143, 3451-3459
44. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912
45. Martinez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO J* 15: 2227-2235.
46. Mashhoon N, Carmel G, Pflugrath JW, Kuret J (2001) Structure of the unliganded cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys.* 387(1): 11-9.
47. Mazón MJ, Behrens MM, Morgado E, Portillo F (1993) Low activity of the yeast cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Tpk3 is due to the poor expression of the *TPK3* gene. *Eur J Biochem* 312: 501-506.

48. Mbonyi K, van Aelst L, Arguelles JC, Jans AW, Thevelein JM (1990) Glucose-induced hyperaccumulation of cyclic AMP and defective glucose repression in yeast strains with reduced activity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol.* 10: 4518-23.
49. Moore MJ, Kanter JR, Jones KC, Taylor SS (2002) Phosphorylation of the catalytic subunit of protein kinase A. *J Biol Chem* 277: 47878-47884.
50. Neves MJ, Jorge JA, Francois JM, Terenzi HF (1991) Effects of heat shock on the level of trehalose and glycogen, and on the induction of thermotolerance in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* 283: 19-22.
51. Nolen B, Taylor S, Ghosh G (2004) Regulation of Protein Kinases: Controlling Activity through Activation Segment Conformation. *Molecular Cell* 15, 661–675
52. Nwaka S, Mechler B, Destruelle M, Holzer H (1995) Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 360: 286-90.
53. Pan X, Heitman J. (2002) Protein kinase A operates a molecular switch that governs yeast pseudohyphal differentiation. *Mol Cell Biol.* 12: 3981-93.
54. Park J, Grant C, Dawes I (2005) The high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: involvement of different branches of the Ras–cyclic AMP pathway in stress responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327 311–319
55. Portela P, Moreno S, Rossi S. Characterization of Yeast Pyruvate kinase1 as a Protein Kinase A substrate. (2006). *In press*
56. Portela P, Moreno S (2005) Glucose-dependent activation of protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae* and phosphorylation of its Tpk1 catalytic subunit. *Cell Signal.* *in press*.
57. Portela P, Van Dijk P, Thevelein JM, Moreno S (2002) Activation state of protein kinase A as measured in permeabilised *Saccharomyces cerevisiae* cells correlates with PKA-controlled phenotypes in vivo. *FEMS Yeast Res* 3: 119-126.
58. Ptacek J, Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, Guo H, Jona G, Breitkreutz A, Sopko R, McCartney RR, Schmidt MC, Rachidi N, Lee S, Mah AS, Meng L, Stark MJR, Stern DF, De Virgilio C, Tyers M, Andrews B, Gerstein M, Schweitzer B, Predki PF & Snyder M. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature Letters* 438: 679- 684
59. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Seraphin B. (2001) The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods* 24, 218–229
60. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 1999;17(10):1030-2
61. Roelants FM, Torrance PD, Thorner J (2004). Differential roles of PDK1 and PDK2 phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology* 150: 3289- 3304.
62. Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2002) Glucose-sensing and –signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* 2: 183-201.
63. Rolland F, Wanke V, Cauwenberg L, Ma P, Boles E, Vanoni M, de Winde JH, Thevelein JM, Winderickx J (2001a) The role of hexose transport and phosphorylation in cAMP signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 1: 33-45.
64. Rolland F, Winderickx J, Thevelein JM (2001b) Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 26: 310-317.
65. Roskoski R (1983) Assay of protein kinase. *Methods Enzymol* 99: 3-6.
66. Ruis H & Schüller C (1995) Stress signalling in yeast. *Bioessays* 17: 959-965.
67. Shabb JB (2001) Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev.* 101: 2381-411.
68. Skalhegg BS, Tasken K (2000) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 5: 678-93
69. Smith A, Ward MP, Garrett S (1998) Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J.* 17(13): 3556-64.
70. Tasken K, Aandahl EM (2004) Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev.* 1:137-67.
71. Tatchell K, Robinson LC, Breitenbach M (1985) RAS2 of *Saccharomyces cerevisiae* is required for gluconeogenic growth and proper response to nutrient limitation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3785-3789

72. Taylor SS, Kim C, Vigil D, Haste N, Yang J, Wu J, Anand G. (2005) Dynamics of signalling by PKA. *Biochem et Biophys acta in press*
73. Thevelein JM, Geladé R, Holsbeeks I, Lagatie O, Popova Y, Rolland F, Stolz F, Van de Velde S, Van Dijck P, Vandormael P, Van Nuland A, Van Roey K, Van Zeebroeck G and Yan B (2005) Nutrient sensing systems for rapid activation of the protein kinase A pathway in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* 33: Part 1.
74. Thevelein JM & de Winde JH (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33: 904-918.
75. Thevelein JM (1994) Signal transduction in yeast. *Yeast* 10: 1753-1790.
76. Thevelein JM, Beullens M, Honshoven F, Hoebeek G, Detremere K, Den Hollander JA & Jans AWA (1987). Regulation of the cAMP levels in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: intracellular pH and the effect of membrane depolarizing compounds. *J Gen Microbiol* 133: 2191-2196.
77. Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Wigler M (1987a) Three different genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50: 277-287.
78. Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Scott JD, McMullen B, Hurwitz M, Krebs EG, and Wigler M (1987b) Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7: 1371-1377.
79. Toda T, Uno I, Ishikawa T, Powers S, Kataoka T, Broek D, Cameron S, Broach J, Matsumoto K, Wigler M (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell*. 40: 27-36.
80. Toner-Webb J, van Patten SM, Walsh DA, Taylor SS (1992) Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 267: 25174-80.
81. Versele M, de Winde JH, Thevelein JM (1999) A novel regulator of G-protein signalling in yeast, Rgs2, downregulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of Gpa2. *EMBO J* 18: 5577-5591.
82. Vigil D, Blumenthal DK, Brown S, Taylor SS, Trewhella J (2004) Differential effects of substrate on type I and type II PKA holoenzyme dissociation. *Biochemistry*. 43(19): 5629-36.
83. Wera S, De Schrijver E, Geyskens I, Nwaka S, Thevelein JM (1999) Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. 3: 621-6.
84. Werner-Washburne M, Brown D, Braun E (1991) Bcy1, the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in yeast, is differentially modified in response to the physiological status of the cell. *J Biol Chem* 266: 19704- 19709
85. Winderickx J, de Winde JH, Crauwels M, Hino A, Hohmann S, Van Dijck P, Thevelein JM (1996) Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Mol Gen Genet*. 252: 470-82.
86. Yonemoto W, McGlone ML, Grant B, Taylor SS (1997) Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *Protein Eng* 10: 915-925.
87. Yonemoto W, McGlone ML, Taylor SS (1993a) N-Myristylation of the Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase Conveys Structural Stability. *J Biol Chem* 268: 2348-2352
88. Yonemoto W, Garrod SM, Bells SM, Taylor SS (1993b) Identification of Phosphorylation Sites in the Recombinant Catalytic Subunit of cAMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* 268: 18626-18632
89. Zaccolo M & Pozzan T (2002) Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science* 295: 1711-5.
90. Zähringer H, Thevelein JM and Nwaka S (2000) Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA affect during stress and growth. *Mol Microbiol* 35: 397-406.
91. Zähringer H, Holzer H and Nwaka S (1998) Stability of neutral trehalase during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the activity of the catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase, TPK1 and TPK2. *Eur J Biochem* 255: 544-551.
92. Zheng J, Knighton DR, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM, Ten Eyck LF (1993) Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Sci*. 2(10): 1559-73.
93. Zoller M, Kuret J, Cameron S, Levin L, Johnson KE (1988) Purification and characterization of C₁, the catalytic subunit of *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase encoded by *TPK1*. *J Biol Chem* 19: 9142-9148.

.....
Dra. Silvia Moreno
Directora

.....
Dra. Paula Portela
Co-Directora

.....
Bioq. Marcelo Pugliesi