UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

ESTUDIO BIOINFORMÁTICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL DE LA SUBUNIDAD REGULATORIA DE LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE cAMP EN MODELOS FÚNGICOS

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

Jimena Julieta Rinaldi

Directora: Silvia Margarita Moreno de Colonna
Directora asistente: Silvia Graciela Rossi
Consejera de estudios: Silvia Margarita Moreno de Colonna

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología Molecular y Transducción de Señales, Departamento de Química Biológica, Facultad Ciencias Exactas y Naturales, Uinversidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2009

Estudio bioinformático, bioquímico y estructural de la subunidad regulatoria de la proteína quinasa dependiente de cAMP en modelos fúngicos

Resumen

La proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) ha sido ampliamente estudiada en modelos de mamíferos. Es un tetrámero compuesto por un dímero de subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C). La subunidad R tiene una estructura modular: un dominio de dimerización y anclaje (D/D) en el extremo N-terminal, a través del cual las subunidades R se unen entre sí y a proteínas de anclaje llamadas AKAPs; dos dominios en tandem de unión a cAMP en el extremo C-terminal (CNB) y una zona bisagra flexible uniendo estas dos regiones estructuradas. La zona bisagra contiene el sitio inhibitorio (IS) que se une al sitio activo de la subunidad C impidiendo la fosforilación de los sustratos.

Esta tesis está concentrada en el estudio bioinformático, bioquímico y estructural de la subunidad R en hongos. Los modelos experimentales utilizados son la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y dos especies de hongos filamentosos del género *Mucor.* Los principales logros son los siguientes.

A diferencia de los dominios CNB, los dominios D/D no están presentes en todas las subunidades R de hongos. El extremo N-terminal de la subunidad R de *S.cerevisiae* (Bcy1) es responsable de la dimerización y es capaz de unirse a la D-AKAP2. La región N-terminal al IS de la zona bisagra participa en la interacción R-C y determina la velocidad de transferencia de fosfato en la reacción de fosforilación. Los dominios CNB de Bcy1, resueltos por cristalografía de rayos x, tienen una arquitectura general similar a las subunidades R de mamíferos, mientras que la orientación relativa y la superficie de contacto entre ambos dominios son diferentes.

Palabras clave: cAMP, proteína quinasa A, hongos, cinética enzimática, cristalografía de rayos X.

Bioinformatic, biochemical and structural analisis of regulatory subunit of cAMP protein kinase in fungal models

Abstract

cAMP-dependent protein kinase (PKA) has been thoroughly studied in mammalian systems. It is a heterotetramer composed of a regulatory subunit dimer (R) and two catalytic subunits (C). The modular R subunit consists of a dimerization and docking domain (D/D) at the N-terminus and two-tandem cAMP-binding domains (CNB) at the C-terminus, jointed by a flexible linker or hinge, which includes a substrate-like inhibitory site (IS) that docks to the active site cleft of the C subunit in the absence of cAMP. The D/D domain not only maintains the protomer as a dimer, but also provides an anchoring surface on which the AKAPs (A kinase anchoring proteins) dock.

This thesis is focused on the bioinformatic, biochemical and structural study of R subunits in fungi. The experimental models used are the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and two species of filamentous fungi from the genre *Mucor*. The principal findings are the following.

Unlike de CNB domains, the D/D are not present in all the fungal R subunits. The N-terminus of the R subunit from *S.cerevisiae* (Bcy1) is responsible for the dimerization and capable of binding to D-AKAP2. The region N-terminal to the IS in the linker participates in the R-C interaction and determines the phosphate transfer rate in the phosphorylation reaction. The CNB domains of Bcy1, resolved by X-ray crystallography have an overall structure similar to the mammalian R subunits, while the relative orientation and contact surface between the two domains are different.

Key words: cAMP, protein kinase A, fungi, enzyme kinetics, X-ray crystalography.

Agradecimientos

A Silvia Moreno y a Silvia Rossi que sin estar alertadas de lo que implicaría se animaron a guiarme en el recorrido serpenteante de mi doctorado y lo hicieron con mucha paciencia, amor y experiencia.

Valoro y tomo como ejemplo la generosidad de Silvia Moreno como política tanto dentro como fuera del laboratorio.

Doy gracias por el acierto de los comentarios críticos de Silvia Rossi con los que fui muchas veces beneficiada durante estos años.

A Paula Portela por la bondad de compartir su intelecto al alentarme en la cristalización y pensar conmigo algunos experimentos.

A mis compañeros del laboratorio por su calidad humana, a los que estuvieron desde el principio y a los que fueron llegando después.

A la dirección, al CODEP, a las secretarías y subcomisiones que hacen que el Departamento funcione y lo haga cada vez mejor.

A los no docentes que intervienen en el funcionamiento del laboratorio: Martín Fea, Gladys Robles, Juan De Jesús y a Susana De Jesús.

A la Universidad pública, laica y gratuita.

A Susan Taylor, Jie Yang y Jian Wu sin los cuales parte de esta tesis no hubiera sido posible.

A Pablo Turjanski por ayudarme con el análisis bioinformático.

A María Iribarne por el acto de amistad de leer y corregir esta tesis.

A Amanda Ernitz, quien me introdujo en el hermoso mundo de la Biología.

A los amigos.

A Violeta Medán y a Gregorio Galiñanes.

A Gerardo, a María, a Norberto, a Lucía y a Paula.

A Augusto.

Publicaciones

Esta tesis dio origen a las siguientes publicaciones:

Rinaldi, J., Ocampo, J., Rossi, S. & Moreno, S. (2008). " A novel activating effect of the regulatory subunit of protein kinase A on catalytic subunit activity." Arch Biochem Biophys 480 (2): 95–103.

Rinaldi J, Wu J, Yang J, Sankaran B, Ralston C, Rossi S, Moreno S & Taylor S. Evolution of PKA signaling: structure of yeast regulatory subunit. En preparación.

Rinaldi, J., Rossi, S. & Moreno, S. Bioinformatic and biochemical analysis of the N-terminal region of regulatory subunidad of protein kinase A in fungal models. En preparación.

INDICE

I.	**INTRODUCCION**	**1**
I.1.	**Proteína quinasa dependiente de cAMP**	**2**
I.1.1.	El cAMP	2
I.1.2.	Función de la PKA	2
I.1.3.	Clasificación de la PKA dentro de las quinasas	3
I.1.4.	La PKA en mamíferos	3
I.1.4.1.	Subunidad catalítica	3
I.1.4.2.	Subunidad regulatoria	4
I.1.4.3.	Holoenzima	9
I.1.4.4.	Activación de la PKA	10
I.1.5.	La PKA en *Saccharomyces cerevisiae*	11
I.1.6.	La PKA en *Mucor*	12
I.1.7.	Proteínas de anclaje a PKA (AKAPs)	13
I.1.8.	Sustratos	15
I.2.	**Cinética enzimática**	**16**
I.2.1.	Ecuación de Michaelis-Menten	16
I.2.2.	Trasferencia de fosfato y liberación de producto	17
I.2.2.1.	Efecto de la viscosidad sobre los parámetros cinéticos	18
I.2.2.2.	Cinética de estado pre-estacionario	20
I.2.2.3.	Modelo de *clamp*	20
I.3.	**Cristalografía de rayos x**	**22**
I.3.1.	Fundamento de la técnica	22
I.3.2.	Esquema general de trabajo	23
I.3.3.	Obtención de la proteína purificada	24
I.3.4.	Cristalización	25
I.3.5.	Montado de cristales	28
I.3.6.	Colección de datos	29
I.3.6.1.	Generalidades de un equipo de difracción de macromoléculas	29
I.3.6.2.	Celda unitaria	31
I.3.6.3.	Indices de Miller	32
I.3.6.4.	De las reflexiones a la densidad electrónica	32
I.3.6.5.	Red recíproca. Construcción de Ewald	33
I.3.7.	Procesamiento de datos	34
I.3.8.	Resolución de la estructura	34
I.3.9.	Refinamiento	35
I.3.10.	Validación	37
I.4.	**Objetivos generales**	**38**
II.	**ANALISIS BIOINFORMATICO**	**40**
II.1.	**Introducción y objetivos específicos**	**41**
II.2.	**Resultados**	**42**
II.2.1.	Colección de secuencias	42
II.2.2.	Predicción de dominios	42
II.2.3.	Predicción de estructura secundaria del extremo N-terminal	44
II.2.4.	Comparación de secuencias de hongos y de mamíferos	44
II.2.5.	Modelado del dominio de D/D	51
II.3.	**Conclusiones y discusión**	**53**
III.	**DOMINIO DE DIMERIZACION Y ANCLAJE**	**55**
III.1.	**Introducción y objetivos específicos**	**56**
III.2.	**Resultados y discusión**	**58**

III.2.1. Estructura cuaternaria de la PKA de *Neurospora crassa* 58
III.2.2. Dimerización del dominio D/D de Bcy1 61
III.2.3. Interacción *in vitro* de Bcy1 y la AKAP D-AKAP2 63
III.3. Conclusiones 65

IV. ZONA BISAGRA 66
IV.1. Introducción y objetivos específicos 67
IV.2. Resultados 69
IV.2.1. Rango lineal temporal y de concentración de enzima 69
IV.2.2. Parámetros cinéticos de péptidos sustrato 70
IV.2.3. Efecto de la viscosidad en los parámetros cinéticos 74
IV.2.4. Efecto dual de los péptidos no-fosforilables 76
IV.2.5. Efecto dual de la subunidad R 78
IV.3. Discusión y conclusiones 80

V. DOMINIOS DE UNION A cAMP 83
V.1. Introducción y objetivos específicos 84
V.2. Resultados 87
V.2.1. Obtención de proteína purificada 87
V.2.2. Cristalización y resolución de estructura 90
V.2.3. Estructura de Bcy1 92
V.3. Conclusiones 101

VI. CONSIDERACIONES FINALES 103
Perspectivas 106

VII. MATERIALES Y METODOS 107
VII.1. Materiales 108
VII.2. Herramientas bioinformáticas 108
VII.3. Procedimiento de cristalografía de rayos X 111
VII.4. Cepas 117
VII.5. Medios de cultivo 118
VII.6. Soluciones 120
VII.7. Preparación de esporas 121
VII.8. Clonado de las mutantes de deleción de Bcy1 121
VII.9. Condiciones de crecimiento 121
VII.10. Cosecha y ruptura de células 123
VII.11. Preparación de proteínas 123
VII.12. Ensayo de actividad quinasa 126
VII.13. Otras herramientas 127
VII. 14. Análisis de los datos 128
VII.15. Estadística 129

Referencias 130
Indice de figuras 137
Indice de tablas 139

Abreviaturas

PKA	Proteína quinasa dependiente de cAMP
DD	Dominio de dimerización y anclaje
R	Subunidad regulatoria
C	Subunidad catalítica
AKAPs	Proteínas de anclaje de PKA
CNB	Dominio de unión a cAMP
IS	Sitio inhibitorio
PBC	Casete de unión a fosfato
Epac	Factor intercambiador de guanina activado por cAMP
PKI	Inhibidor de proteína quinasa A
Pyk1	Piruvato quinasa 1
AKB	Dominio de unión a proteína quinasa A
MR	Reemplazo molecular

CAPITULO I:
INTRODUCCION

I.1. PROTEINA QUINASA DEPENDIENTE DE cAMP

I.1.1. El cAMP

El concepto de segundo mensajero en el proceso de internalización de señales nació con el descubrimiento del nucléotido cíclico 3´-5´-adenosina monofosfato (cAMP) (figura I.1) y sus efectos sobre el metabolismo, la forma celular y la transcripción, a través de la fosforilación reversible de proteínas (Sutherland, E.W., 1972). El cAMP es producido por la adenilato ciclasa en respuesta a una variedad de señales extracelulares. Niveles elevados de cAMP en la célula llevan a la activación de las moléculas blanco. La proteína quinasa dependiente de cAMP o proteína quinasa A (PKA) fue la primera molécula conocida que une cAMP y probablemente la más estudiada (Walsh, D. A. et al., 1968). Esta molécula se ha convertido en un modelo estructural y funcional de proteínas quinasas. Posteriormente se han descripto otras moléculas que unen cAMP: la proteína activadora de genes por catabolito (Zubay, G. et al., 1970), el receptor de *Dictyostelium discoideum* (Klein, P.S. et al 1988), los canales iónicos gatillados por núcleotidos cíclicos (Goulding, E. H. et al., 1992) y el factor intercambiador de guanina activado por cAMP (Epac) (de Rooij, J. et al., 1998; Kawasaki, H. et al., 1998).

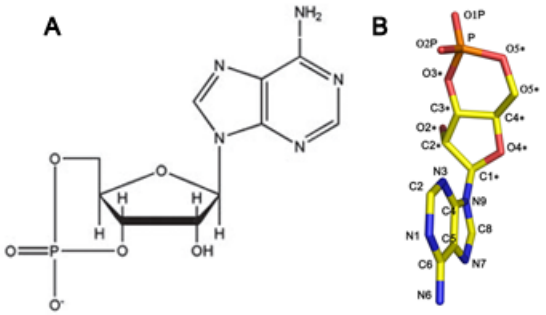


Figura I.1. Estructura química del cAMP.

I.1.2. Función de la PKA

La proteína quinasa A es una enzima que cataliza la reacción de fosforilación de sustratos proteicos. En esta reacción se transfiere el fosfato γ del ATP a un grupo hidroxilo de la proteína sustrato (figura I).

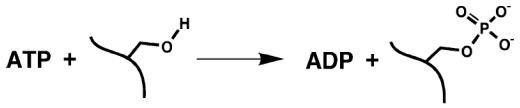


Figura I.2. Reacción de transferencia de fosfato.

I.1.3. Clasificación de la PKA dentro de las quinasas

La PKA pertenece a la familia de las AGC quinasas, un grupo de serina-treonina quinasas. El nombre de AGC quinasas proviene de proteína quinasa A, proteína quinasa G y proteína quinasa C. Este grupo de quinasas se caracteriza por poseer (i) en el extremo N-terminal uno o más dominios que determinan total o parcialmente su localización; (ii) un dominio catalítico y (iii) un dominio C-terminal regulatorio con un sitio consenso hidrofóbico (Sobko, A., 2006).

I.1.4. La PKA en mamíferos

La PKA fue identificada en tejido esquelético de mamífero por primera vez en 1968 (Walsh, D. A. et al., 1968). Desde entonces la PKA de mamíferos ha sido intensamente estudiada a nivel estructural, cinético y funcional. El modelo de mamífero es sin lugar a dudas el más estudiado y prácticamente todo lo que se sabe acerca de la PKA se ha descubierto en PKA de mamíferos. Otros modelos utilizados para el estudio de la PKA son *Dictyostelium discoideum*, *Saccharomyces cerevisiae* y varios hongos filamentosos entre los que se encuentran *Mucor rouxii* y *Neurospora crassa*.

La PKA en mamíferos es un tetrámero formado por un dímero de subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C). La subunidad regulatoria interacciona con el sitio activo de la subunidad catalítica, impidiendo su actividad. Cuando el cAMP se une a la subunidad regulatoria, disminuye la afinidad R-C y queda libre el sitio activo de la subunidad catalítica siendo posible la fosforilación de sustratos (figura I.3).

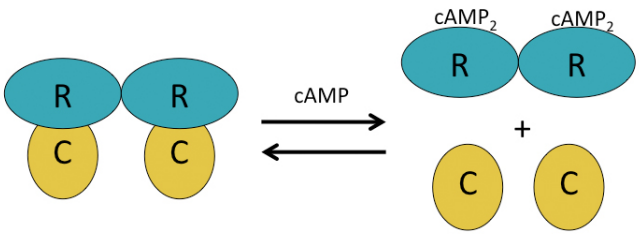


Figura I.3. Esquema general de la estructura de la holoenzima. Modelo clásico de activación.

I.1.4.1. Subunidad catalítica

Existen tres genes que codifican para la subunidad catalítica: α, β y γ. La isoforma α se expresa en todas los tipos celulares, mientras la expresión de las isoformas β y γ está restringida a ciertos tejidos. Las tres isoformas presentan una identidad de secuencia de alrededor de 80% (Beebe S.J. et al., 1990).

En 1991 el grupo de Susan Taylor cristalizó la isoforma α unida a ATP y al péptido correspondiente a los aminoácidos 5 al 24 del inhibidor de proteína quinasa A (PKI), un péptido que regula la actividad y la localización de la subunidad C (Knighton, D.R. et al., 1991a). Fue la primera estructura de una quinasa que se obtuvo. La subunidad catalítica está compuesta por un *core* bilobular muy conservado en todo el grupo de las quinasas, un dominio helicoidal en el extremo N-terminal que tiene un sitio de miristoilación y un dominio C-terminal que se expande a través de la superficie del *core* (Johnson D.A. et al., 2001). El lóbulo pequeño está compuesto de cinco hojas β antiparalelas y una α-hélice. El lóbulo mayor en cambio, está dominado por cinco α-hélices (figura I.4). El sustrato proteico se une al *loop* catalítico ubicado en este lóbulo. Ambos lóbulos forman una hendidura donde se posiciona el ATP.

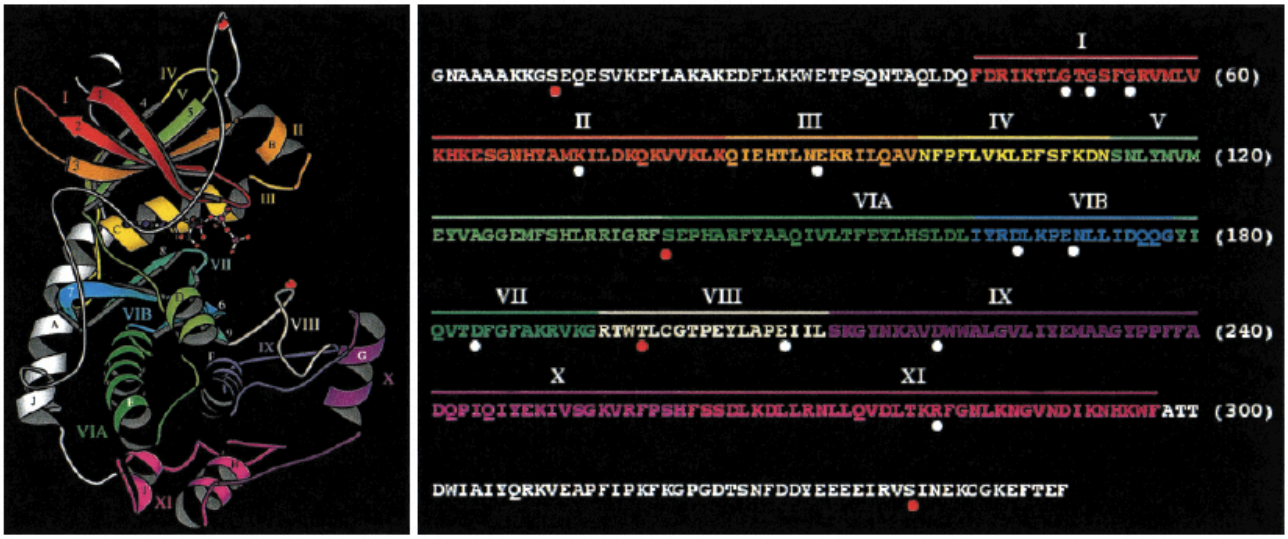


Figura I.4. (Johnson, D.A. et al., 2001) Estructura cristalográfica (izquierda) y secuencia de la subunidad catalítica α (derecha). El patrón de colores de la estructura se corresponde con el de la secuencia del *core* conservado en todas las quinasas (I-XI).

La posición relativa de ambos lóbulos es variable. La subunidad C es capaz de adoptar diferentes conformaciones a lo largo de la catálisis (Taylor, S.S. et al., 2004).

I.1.4.2. Subunidad regulatoria

A diferencia de otras quinasas, la subunidad C está regulada negativamente por la subunidad R. Existen dos tipos de subunidades regulatorias en mamíferos: I y II. Cada tipo tiene dos isoformas: α y β. Estas cuatro isoformas corresponden a cuatro genes diferentes.

Todas comparten la siguiente estructura modular: en el extremo N-terminal, un dominio de dimerización y anclaje (D/D), a través del cual las subunidades regulatorias se unen entre sí y a otras proteínas de anclaje a PKA (AKAPs); hacia el extremo C-terminal los dominios en *tandem* de unión a cAMP (CNB) y entre estas dos regiones bien estructuradas se encuentra un dominio

desplegado llamado zona *linker* o bisagra que incluye el sitio inhibitorio (IS) que se asemeja al sitio consenso de fosforilación de los sustratos (figura I.5). La región hacia el N-terminal del IS se conoce como *linker I*, mientras que la región hacia el C-terminal del IS se llama *linker II*.

Figura I.5. Estructura modular de la subunidad regulatoria.

No se conoce hasta el momento la estructura de alta resolución de la subunidad R entera, pero sí de los dominios D/D y CNB. Es probable que la imposibilidad de cristalizar la subunidad regulatoria entera se deba a la flexibilidad de la región *linker*.

En las siguientes secciones se describirán cada uno de los dominios mencionados.

I.1.4.2.1. Dominio de dimerización y anclaje

Uno de los mecanismos a través del cual la PKA logra especificidad es la localización subcelular. La PKA es parte de grandes complejos de señalización. El anclaje a dominios subcelulares está mediado en gran medida por proteínas llamadas AKAPs (Pawson T. & Scott J.D., 1997). Estas proteínas se unen al dominio D/D de la subunidad R de la PKA.

Las estructuras del dominio D/D obtenidas por RMN (Newlon, M.G. et al., 1999; Banky, P. et al., 2003) y cristalografía de rayos X (Kinderman, F.S. et al., 2006; Gold, M.G. et al., 2006) muestran un dímero antiparalelo de dos cadenas polipeptídicas con un motivo α-hélice-vuelta-α-hélice, en disposición de X (*four helix bundle*) (figura I.6).

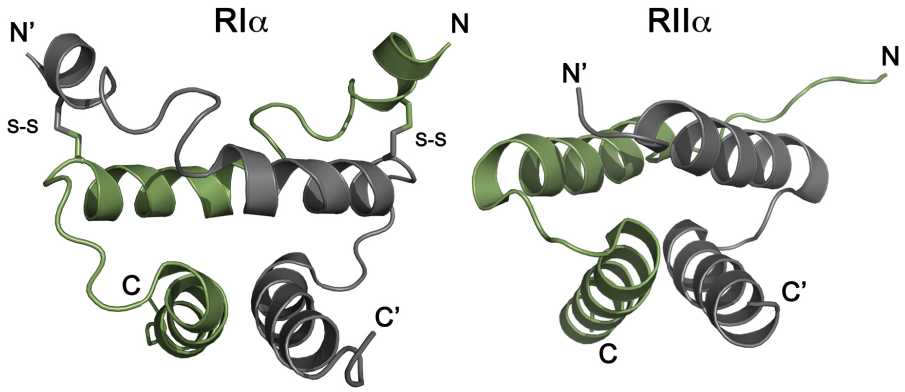


Figura I.6. Estructura de los dominios D/D de RIα (Banky, P. et al., 2003) y de RIIα (Kinderman, F.S. et al., 2006). Se muestran en representación de *sticks* los puentes disulfuro.

Esta estructura provee la superficie de interacción con las AKAPs, razón por la cual la dimerización es un requisito para la unión de AKAPs. Se identificaron por un lado aminoácidos necesarios para la dimerización y por otro para la unión de AKAPs, que no son necesarios para la dimerización (figura I.7).

Si bien la estructura es conservada (comparando RI y RII) (figura I.6) la secuencia no se conserva (figura I.7).

A diferencia de las subunidades RII, las subunidades RI tienen dos puentes disulfuro (figura I.6).

```
                                        Hélice N-1        Hélice I         Hélice II
                                                 *    *           *          *    *
Mus musculus RIα          1 MASGSMATSEEERSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTTRPERPMAFLREYFERLEKEEA 62
Rattus norvegicus RIα     1 MASGSMAASEEERSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEA 62
Human RIα                 1 MESGSTAASEEARSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEA 62
Bovine RIα                1 MASGTT_ASEEERSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFEKLEKEEA 61

                                            * *
Mus musculus RIIα                       1 MSHIQIPAGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVDFAVEYFTRLREARR 45
Rattus norvegicus RIIα                  1 MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVDFAVEYFTRLREARR 45
Human RIIα                              1 MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA 45
Bovine RIIα                             1 MSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQRPPDLVDFAVDYFTRLREARS 45

                                                          *       **               *
Mus musculus RIIβ                       1 MS_IEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENE 44
Rattus norvegicus RIIβ                  1 MS_IEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENE 44
Human RIIβ                              1 MS_IEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENE 44
Bovine RIIβ                             1 MS_IEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQEENE 44
```

Figura I.7. (Hausken, Z.E. et al., 1994; Li, Y. & Rubin, C. S.,1995; Banky, P. et al., 1998) Alineamiento de las secuencias correspondientes al dominio D/D de RIα, RIIα y RIIβ. Para cada secuencia a izquierda y derecha se indica la numeración de aminoácidos. Las secuencias están coloreadas de acuerdo a la estructura: rojo, α-hélice; verde, *loop* y negro, no determinada. Los residuos que se conservan en todas las secuencias están en negrita. Los asteriscos azules indican los residuos necesarios para la unión a AKAP, mientras que los asteriscos negros muestran los aminoácidos esenciales para la dimerización.

I.1.4.2.2. Zona bisagra

Uniendo a los dominios D/D y CNBs se encuentra la zona *linker* o bisagra. Esta incluye el sitio inhibitorio (IS), que se asemeja al sitio consenso de fosforilación de los sustratos de PKA. Tiene tan sólo cuatro residuos: RRXS/A. Este motivo se une al sitio activo de la subunidad C, inhibiendo la fosforilación de los sustratos.

Las subunidades RI tienen una Ala en el sitio inhibitorio (sitio de pseudosustrato), mientras que las subunidades RII tienen una Ser en esta posición, la cual es autofosforilada (sitio de autofosforilación).

El *linker* es una region desordenada, que tiene gran flexibilidad (Li, F. et al., 2000). Su secuencia es altamente repetitiva y muy poco conservada. Se han predicho sitios de fosforilación y de interacción proteína-proteína (Vigil, D. et al., 2004a).

I.1.4.2.3. Dominios de unión a cAMP

Los dominio de unión a cAMP están muy conservados. Las estructuras de RIα (Su, Y. et al., 1995) y de RIIβ (Diller, T.C. et al., 2001) comparten la misma arquitectura con otros dominios de unión a nucleótidos cíclicos. La secuencia de los dominios de unión a núcleotidos cíclicos es muy conservada (figura I.8).

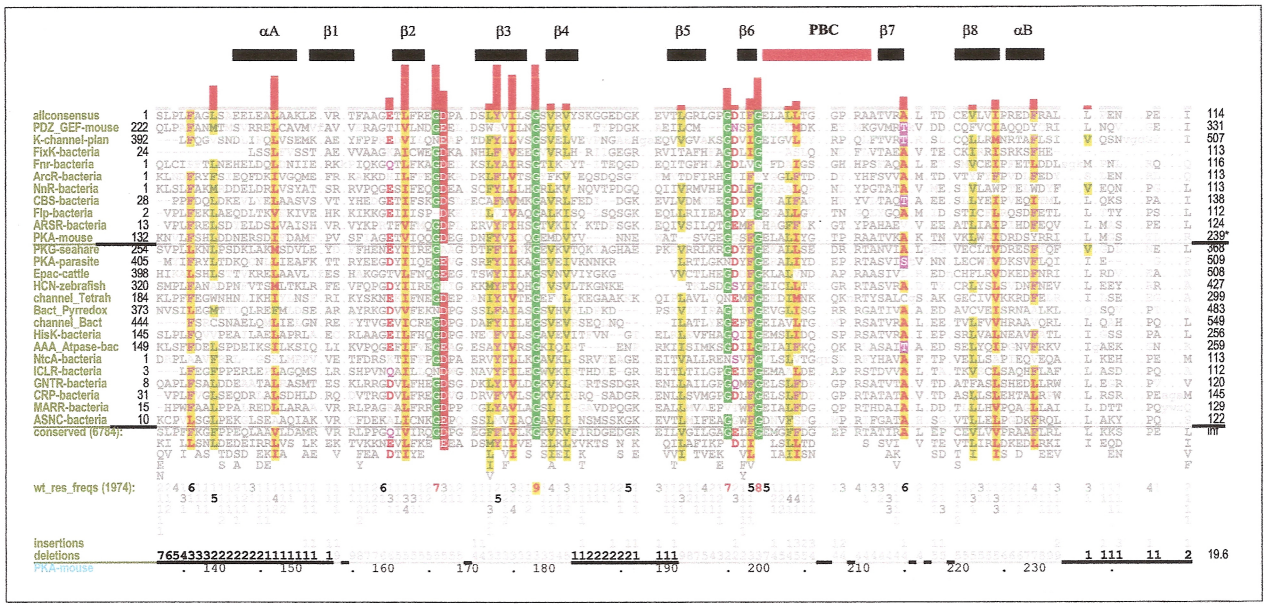


Figura I.8. (Kannan, N. et al., 2007) Comparación de secuencias de dominios de unión a núcleotidos cíclicos. Las posiciones coloreadas en el alineamiento y el histograma corresponden a regiones conservadas. Arriba se indica la estructura secundaria: en negro las hojas β y en rojo el PBC.

Cada dominio consiste en dos subdominios: un subdominio α y un subdominio β. Este último es un sandwich tipo β relativamente rígido (figura I.9). Contiene además un motivo muy conservado llamado casete de unión a fosfato (PBC), al cual se une el cAMP.

El PBC es un motivo de catorce aminoácidos, que está presente en todos los dominios de unión a nucleótidos cíclicos. Está formado por un *loop* y una α-hélice. Tiene tres componentes claves de interacción con la molécula de cAMP (figura I.10): la Arg que se une al fosfato y el Glu que se une al hidroxilo de la ribosa y un residuo tapa o *capping* que interacciona con el anillo de la adenina (Berman, H.M. et al., 2005).

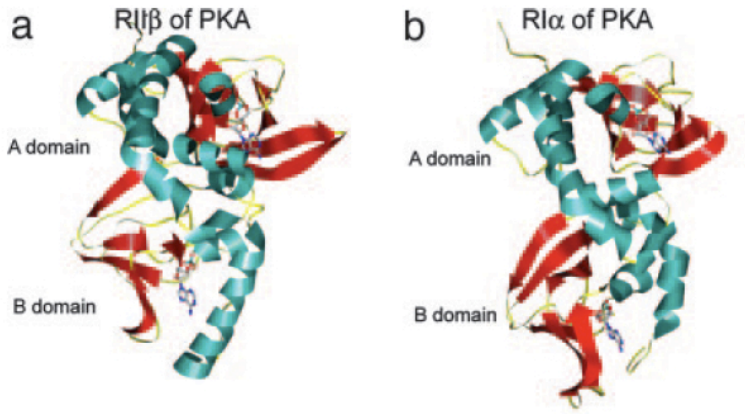


Figura I.9. (Berman, H.M. et al., 2005) Estructuras de los CNBs de (a) RIIβ y de (b) RIα. Las estructuras están coloreadas de acuerdo con la estructura secundaria.

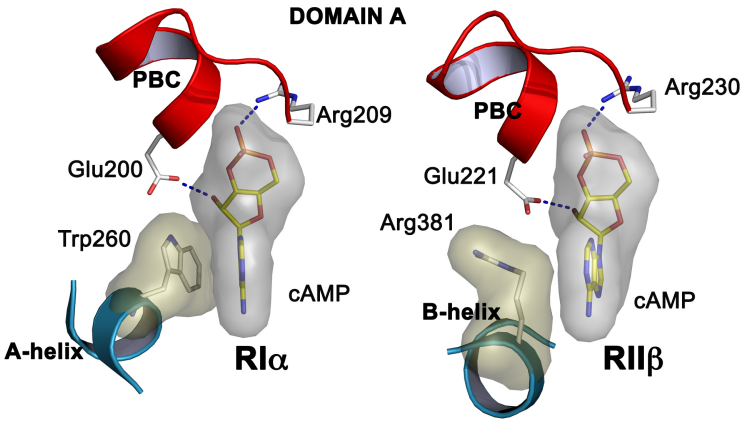


Figura I.10. Estructura del PBC del dominio A de RIα y RIIβ.

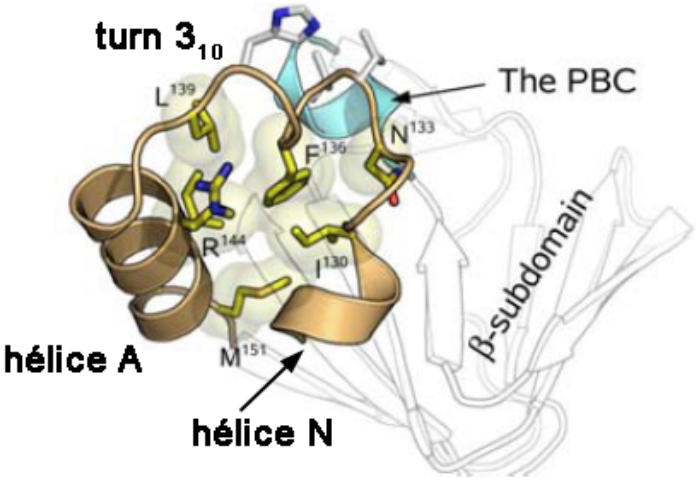


Figura I.11. (Kornev, A. et al., 2008) Estructura del motivo N3A. Como *cartoon* se muestran la hélice N, el *turn* 3_{10} y la hélice A. Los residuos que determinan la estructura del *turn* 3_{10} están mostrados como *sticks*.

El subdominio helicoidal es más dinámico. Consiste en un motivo llamado N3A y las hélices B-C. El motivo N3A está formado por dos α-hélices, la hélice N y la hélice A, separadas por un *loop* de 8 residuos, que tiene estructura de *turn* 3_{10} y se lo denomina *3_{10} loop* (Kornev A. et al., 2008) (figura I.11).

Las hélices B-C del dominio A junto con la hélice N del dominio B constituyen la bisagra que une ambos dominios (figura I.13).

I.1.4.3. Holoenzima

Las estructuras cristalográficas de los heterodímeros RIα(91-379)-C y RIIα(90-400)-C han permitido conocer las zonas de interacción en ambas subunidades (Kim, C. et al., 2005; Kim, C. et al 2007; Wu, J. et al., 2007). La zona de contacto está muy extendida. Se describieron cuatro sitios que involucran las siguientes regiones de la subunidad R: (1) IS; (2) PBC y *loop* 3_{10} del CNB-A; (3) α-hélice B/C del CNB-A y el *loop* 3_{10} y α-hélice A del CNB-B; (4) α-hélice B del CNB-B (figura I.12).

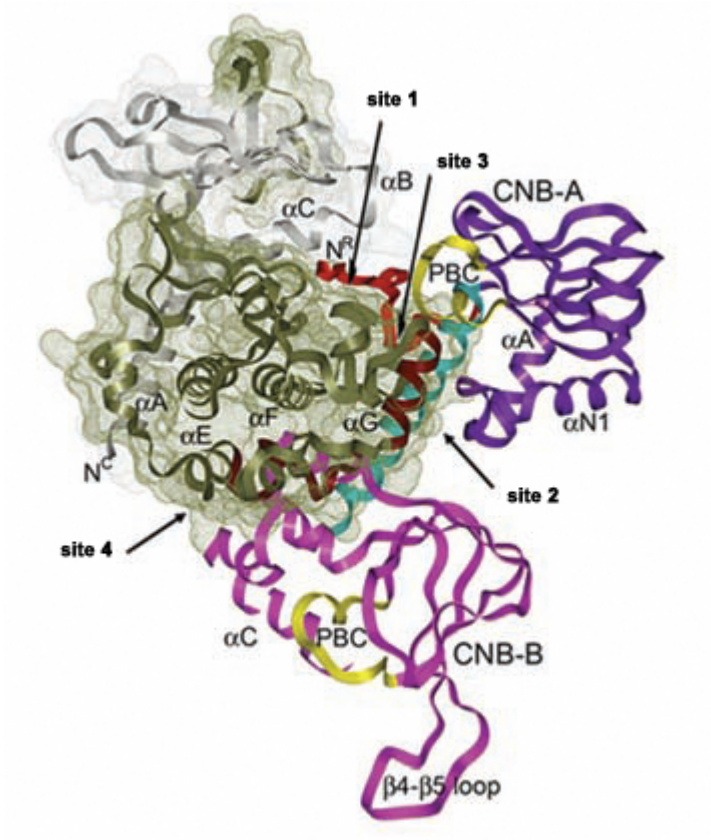


Figura I.12. (Wu, J. et al., 2007) Estructura del complejo RIIα(90-400)-C. El lóbulo menor y el mayor de la subunidad C están coloreados de gris y marrón, respectivamente. Los CNB A y B están coloreados de violeta y fucsia, respectivamente. Los PBCs, de amarillo; el *linker* de rojo y las hélices B y C de turquesa. Se señalan los 4 sitios de interacción.

Se ha observado además, por experimentos de fluorescencia y de resonancia de plasmón superficial que la región de 20 aminoácidos hacia el extremo N-terminal del IS forma parte de la superficie de interacción entre las subunidades R y C, tanto para el heterodímero R-C de tipo de I como para el de tipo II (Li, F. et al., 2000; Cheng, X. et al., 2001). La región en la subunidad C comprometida en cada caso es diferente.

I.1.4.4. Activación de la PKA

La PKA al igual que otras moléculas activables por cAMP muestra un comportamiento alostérico. En la holoenzima el CNB-B es accesible y se une primero al cAMP. La unión subsecuente al sitio A lleva a la liberación de la subunidad C, de acuerdo al modelo clásico. El mecanismo de activación de la PKA no está completemente dilucidado aún. Se cree que la comunicación entre los dominios CNB es clave en el proceso de activación.

La subunidad R sufre grandes cambios conformacionales al unirse a la subunidad C (Wu, J. et al., 2007; Kim, C. et al., 2007). Estos cambios involucran el ordenamiento del *linker* y la reorganización de los subdominios α-helicoidales de los CNBs (figura I.13). Las α-hélices B, C del CNB-A y la α-hélice N del CNB-B se extienden en una única hélice larga, la cual interacciona directamente con la subunidad C.

De acuerdo al modelo clásico, la activación de la PKA por cAMP se da a través de la disociación de la holoenzima. Sin embargo, existen evidencias experimentales que apoyan la idea de una activación sin disociación completa, es decir de una holoenzima con actividad (Yang, S et al., 1995; Johnson, D.A. et al., 1993; Vigil, D. et al., 2004b).

Para la holoenzima de tipo I la disociación completa se alcanza agregando sustrato junto con el cAMP. En el caso de la holoenzima de tipo II una proporción de holoenzima permanece intacta aún luego del agregado de cAMP y sustrato (Vigil, D. et al., 2004b; Viste, K et al., 2005).

Otra diferencia entre la PKA de tipo I y II es el requerimiento de ATP-Mg^{2+} para la formación de la holoenzima: a diferencia de la de tipo II, la de tipo I requiere ATP-Mg^{2+} (Wu, J. et al., 2007).

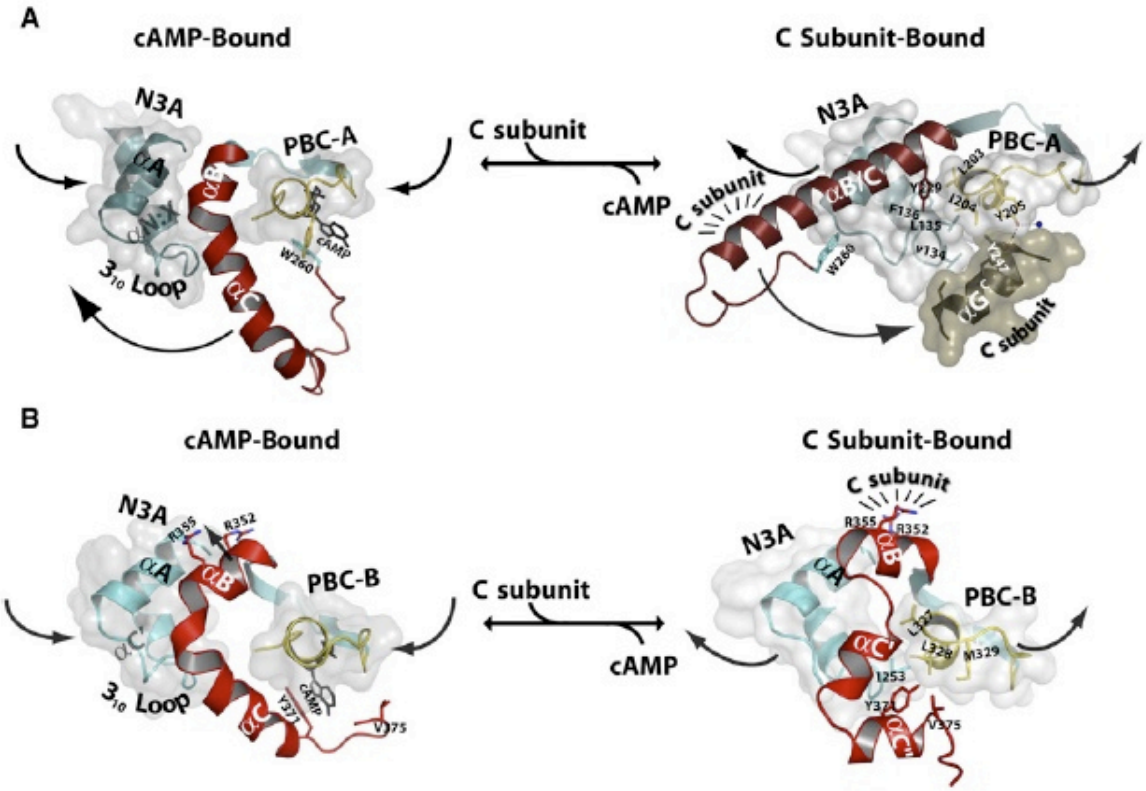


Figura I.13. (Kim, C. et al., 2007) Comparación de los subdominios α-helicoidales de las estructuras de R unidas a cAMP y a la subunidad C. A) α-hélice B/C del CNB-A. B) α-hélice B/C del CNB-B.

I.1.5. La PKA en *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae es un hongo levaduriforme perteneciente al *Filum* Ascomycetes . Es el modelo de célula eucariota más utilizado para el estudio de transducción de señales. Mucho de lo que se conoce acerca de la vía de internalización de señales de PKA se aprendió de este sistema.

Existen tres genes que codifican para la subunidad C, TPK1, TPK2 y TPK3 (Toda, T. et al., 1987a) y un gen que codifica para la subunidad R, BCY1 (Toda, T. et al., 1987b).

Las secuencias de las Tpks tienen una identidad de alrededor del 50% con las subunidades C de mamíferos. La identidad entre Tpk1 y Tpk3 es del 86%, entre Tpk2 y Tpk1 de 75% y entre Tpk2 y Tpk3 de 76%. La diversidad está restringida al extremo N-terminal. La Tpk2 tiene un extremo N-terminal más largo, rico en Gln.

La deleción de los tres genes de Tpk es letal. Sin embargo la presencia de uno solo de ellos (cualquiera sea) basta para que la célula viva (Toda, T. et al., 1987b). La disrupción de Bcy1 no es letal, pero genera sensibilidad a *shock* térmico y a la deprivación de fuente de nitrógeno.

De las tres subunidades C la Tpk1 es la más estudiada. Es inhibible por la subunidad R de mamíferos así como por su propia subunidad R (Bcy1) y por PKI.

De estas cuatro proteínas sólo se conoce la estructura de la mutante de deleción Δ80-TPK1 (Mashhoon, N. et al., 2001). La estructura es similar a la Cα de mamíferos (figura I.14).

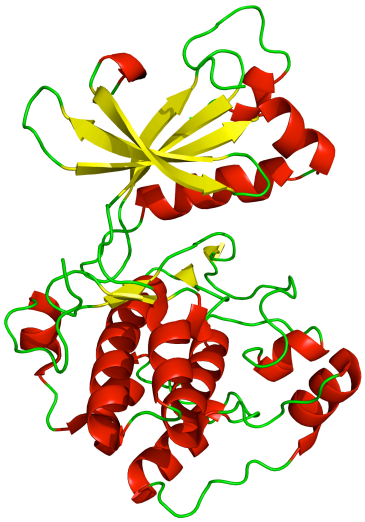


Figura I.14. Estructura de la Tpk1. El patrón de colores corresponde a la estructura secundaria.

La secuencia de Bcy1 presenta alrededor de 40% de identidad con las subunidades R de mamíferos. Como todas las subunidades de hongos, la Bcy1 tiene un IS con una Ser autofosforilable. Tiene dos sitios de unión a cAMP conservados (Johnson, K.E. et al., 1987). La secuencia del extremo N-terminal no se parece a la de mamíferos. La región correspondiente a los primeros 124 aminoácidos es necesaria y suficiente para la localización subcelular de Bcy1 (Griffioen, G. et al., 2000).

I.1.6. La PKA en *Mucor*

El estudio de la PKA en *Mucor* nació con el descubrimiento del rol del cAMP en el control del dimorfismo en el hongo *Mucor rouxii*. El género *Mucor* pertenece al *Filum* Glomeromycetes. *M.rouxii y circinelloides*, como otras especies de *Mucor* tiene la habilidad de crecer con dos morfologías diferentes: células esféricas levaduriformes que se reproducen por gemación o micelio típico, dependiendo de las condiciones (Barnicki-García, S & Nickerson, W.J., 1962). La germinación de las esporas ocurre en dos etapas. Las esporas elipsoidales crecen primero dando grandes estructuras esféricas. Luego se producen los tubos germinativos, que darán origen al micelio (Cano, C. et al., 1988). El cAMP agregado al medio de cultivo induce el crecimiento isodiamétrico en condiciones que de otra manera hubieran llevado al crecimiento polarizado (Pereyra, E. et al., 1992).

Al igual que la PKA de mamíferos, la PKA de *Mucor* es un tetrámero, formado por dos subunidades R y dos subunidades C (Pastori, R. et al., 1985).

Tiene la propiedad particular de no disociarse con simple agregado de cAMP. La disociación se logra con el agregado además de cAMP, de NaCl o policationes (Moreno, S. et al., 1980; Ocampo, J. et al., 2007).

La PKA de *Mucor rouxii* contiene dos sitios cooperativos de unión a cAMP en cada subunidad R, cuyas propiedades son similares a las de la PKA de mamíferos. Sin embargo la selectividad de la unión a análogos de cAMP es diferente. Se ha identificado un complejo ternario holoenzima-cAMP formado por la holoenzima y dos moléculas de cAMP unidas al sitio B (Paveto, C. et al., 1989).

Estas características hacen a la PKA de *Mucor* un buen modelo para el estudio del mecanismo de activación, aún no completamente dilucidado.

La especificidad del sitio consenso de fosforilación de los sustratos por parte de la subunidad C de *M.rouxii* es similar al observado para la Cα (Zaremberg, V. et al., 2000).

El grado de activación de la holoenzima depende del sustrato que se utilice. Existen dos interpretaciones posibles de esta observación: el sustrato participa en la disociación de la holoenzima y/o la holoenzima tiene actividad (Zaremberg, V. et al., 2000). La participación del sustrato en la disociación de la holoenzima ha sido comprobada en mamíferos (apartado I.1.4.4.).

El número de genes que codifican para la subunidad R y C aún no se conoce. Se ha identificado un sólo gen que codifica para la subunidad R (Sorol, M.R. et al., 2000). Su secuencia presenta un 50% de identidad con respecto a las subunidades R de mamíferos. Recientemente se ha comenzado a secuenciar el genoma de *Mucor circinelloides*.

I.1.7. Proteínas de anclaje a PKA (AKAPs)

Diferentes ligandos pueden regular negativa o positivamente los niveles de cAMP, a través de receptores acoplados a proteínas G. El cAMP activa a una amplia variedad de substratos de PKA. La especifidad de la señal se logra a través de (1) microdominios de cAMP generados por adenilato ciclasas (AC), (2) terminación de la señal por degradación de cAMP por las fosfodiesterasas (PDE) y (3) anclaje de la PKA a dominios subcelulares por proteínas de anclaje de la PKA, AKAPs (*A kinase anchoring proteins*) (figura I.15) (Jarnæss, E. & Taskén, K., 2007).

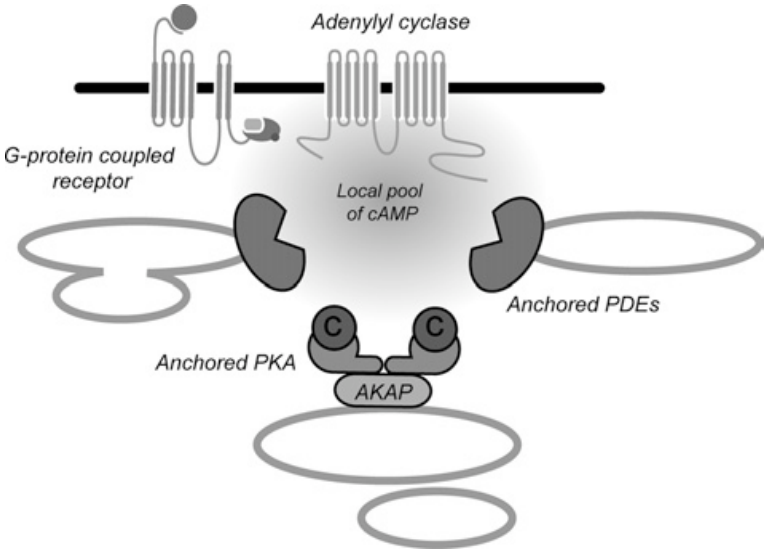


Figura I.15. (Jarnæss, E. & Taskén, K., 2007) Mecanismos descriptos por los cuales se logra la especificidad en la señal de PKA: microdominios localizados de cAMP, PDEs y anclaje de PKA por proteínas AKAPs.

La localización de la PKA en mamíferos está principalmente determinada por proteínas AKAPs, que se unen a los dímeros R_2. La PKA de tipo I es considerada clásicamente citoplasmática, mientras que la de tipo II es tipicamente particulada y restringida a estructuras subcelulares a las cuales está anclada por proteínas AKAPs (Carr D.W. et al., 1992; Herberg F.W. et al., 2000). Sin embargo se conocen también proteínas AKAPs duales que unen tanto RI como RII (Huang L.J. et al., 1997 a y b). En los últimos años se han identificado algunas AKAPs que unen preferentemente RI. (Jarnæss, E. et al., 2008).

Aún no se conoce mucho acerca de la estructura de las proteínas AKAPs enteras. Se ha caracterizado exhaustivamente el dominio de unión al dímero R_2 (Carr, D.W., et al., 1991) llamado dominio AKB (*A kinase binding domain*).

A través del dominio D/D en el extremo N-terminal, los dímeros de subunidades regulatorias se asocian a una α-hélice anfipática de 14-18 residuos presentes en todas las AKAPs (Newlon, M.G. et al., 1999). La α-hélice de la AKAP se une diagonalmente a las α-hélices antiparalelas del dímero de R (figura I.16).

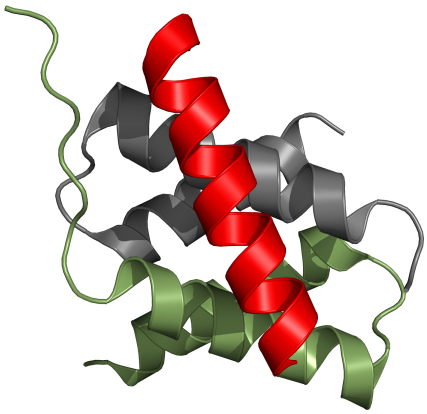


Figura I.16. (Kinderman, F.S. et al., 2006) Estructura del dominio D/D de RIIα en complejo con el péptido correspondiente a la región 631-649 de la D-AKAP2.

Las proteínas AKAPs son plataformas multivalentes a las cuales se asocian no sólo la PKA sino también otras moléculas de señalización, como sustratos, fosfatasas y otras quinasas (Feliciello, A. et al., 2001).

Las proteínas AKAPs descriptas hasta el momento se encuentran en su gran mayoría en mamíferos. No se conocen aún AKAPs en otros organismos.

I.1.8. Sustratos.

Los sustratos de la PKA son el ATP, que es el dador de fosfato y una proteína, que es el aceptor de fosfato. Las proteínas sustrato presentan una Ser o una Thr (cuyo –OH reacciona con el ATP), en el contexto de los siguientes motivos: Arg-Arg-X-Ser/Thr, Arg/Lys-X-X-Ser/Thr y Arg/Lys-X-Ser/Thr, en donde X puede ser cualquier aminoácido (Shabb, J.B., 2001). Péptidos derivados de las secuencias consenso de sustratos fisiológicos son reconocidos y fosforilados por la subunidad C, lo cual permite utilizar péptidos como sustratos en los experimentos. El kemptido, derivado de la piruvato quinasa de cerdo se ha convertido en un péptido-sustrato clásico de PKA (Kemp, B.E. et al., 1977).

Las proteínas sustrato participan en la regulación de diferentes procesos celulares como transcripción, flujo de iones, crecimiento, muerte (Walsh, D.A. et al., 1992). Se han descripto varias proteínas sustrato en diferentes organismos. En esta tesis se realizaron algunos experimentos con la piruvato quinasa 1 de *Saccharomyces cerevisiae* (Pyk1), la cual ha sido identificada como sustrato de la PKA (Portela, P. et al., 2002) y caracterizada bioquímicamente (Portela, P. et al., 2006). Es una enzima que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato, el último paso de la glucólisis.

I.2. CINÉTICA ENZIMÁTICA

La reacción catalizada por las quinasas requiere ATP y proteína sustrato y por lo tanto se considera que el mecanismo de reacción es de bisustrato. Existen evidencias experimentales que indican que el orden de entrada de un sustrato o el otro es al azar para la subunidad Cα (Cook, P.F. et al., 1982; Kong, C.T. & Cook, P.F., 1988).

I.2.1. Ecuación de Michaelis-Menten

A concentraciones saturantes de ATP, la reacción en presencia de subunidad C libre de subunidad R se comporta como de monosustrato y sigue una cinética de tipo Michaelis-Menten (figura I.17).

$$\text{C-ATP + SUSTRATO} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{C-ATP-SUSTRATO} \xrightarrow{k_2} \text{C + ADP + SUSTRATO-P}$$

Figura I.17. Esquema que representa la reacción de fosforilación bajo el modelo de Michaelis-Menten.

En estado estacionario - período temporal de la reacción durante el cual la concentración de complejo enzima-sustrato es constante- la ecuación que describe la velocidad de la reacción es

$$V = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_m} \qquad \text{ecuación 1}$$

donde

$$V_{max} = k_2 \cdot [C]_T \qquad \text{ecuación 2}$$

en donde $[C]_T$ es la concentración de enzima total y

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \qquad \text{ecuación 3}$$

El gráfico de velocidad en función de la concentración de sustrato de acuerdo a la ecuación 1 tiene forma de hipérbola (figura I.18).

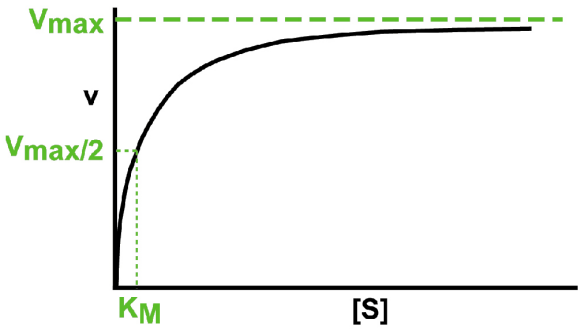


Figura I.18. Gráfico de Michaelis-Menten. Se grafica la función de la ecuación 1 y se muestran los parámetros cinéticos V_{max} y K_m.

La k_2 se denomina constante catalítica (k_{cat}) ya que corresponde al paso catalítico. También se la llama *turnover number* de la enzima, pues define el número de eventos catalíticos por unidad de tiempo y por unidad de enzima.

Para lograr el estado estacionario el número de moléculas de sustrato debe estar en exceso con respecto al número de moléculas de enzima; la enzima debe estar en una concentración dentro del rango lineal y la reacción debe ser medida dentro del rango temporal lineal (Coperland, R.A., 2000).

Debido a que la K_m incluye a las k_{-1} y a la k_1, las cuales determinan la afinidad (K_d)

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1} \qquad \text{ecuación 4}$$

tradicionalmente se la ha utilizado para estimar y comparar la afinidad de los sustratos, aunque este parámetro no es una medida directa de la afinidad (K_d).

Durante el estado estacionario la velocidad de formación de producto es constante. Antes de llegar a esta condición (estado pre-estacionario), la velocidad de formación de producto es variable y se estabiliza al llegar al estado estacionario.

La eficiencia catalítica se define como el cociente k_{cat}/K_m. Se la utiliza para comparar diferentes sustratos de una misma enzima.

I.2.2. Trasferencia de fosfato y liberación de producto

Abandonando el modelo simplificado de la ecuación 1 podemos decir que la reacción de fosforilación se compone de tres eventos fundamentales: la unión del sustrato (k_{-1} y k_1), la

transferencia del grupo fosfato (k_2 y k_{-2}) y por último la liberación de producto, que es irreversible (k_3) (Lieser, S.A. et al., 2005) (figura I.19). La k_3 es la velocidad de disociación del ADP, pues la K_d de los péptidos fosforilados es mucho más alta que la del ADP (Whitehouse, S. et al., 1983).

$$\text{C-ATP + SUSTRATO} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \text{C-ATP-SUSTRATO} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} \text{C-ADP-SUSTRATO-P} \xrightarrow{k_3} \text{C + ADP + SUSTRATO-P}$$

Figura I.19. Esquema que representa la reacción de fosforilación. El segundo paso de la figura I.17 en este esquema está separado en la transferencia del fosfato y la liberación de producto.

Bajo este esquema

$$K_m = \frac{k_d + k_2/k_1}{k_2/k_3 + 1} \qquad \text{ecuación 5}$$

Escrito de otra manera

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_2 + k_3} \cdot \frac{k_3}{k_1} \qquad \text{ecuación 6}$$

Si el paso de transferencia de fosfato es lento ($k_{-1} > k_2 < k_3$), la K_m y la K_d toman valores similares. El *turnover number* está en este caso determinado por la transferencia de fosfato, el paso limitante. Existen dos aproximaciones experimentales que permiten estimar la velocidad de transferencia de fosfato: efecto de la viscosidad en los parámetros cinéticos de estado estacionario y cinética de estado pre-estacionario (Adams, J.A., 2001).

I.2.2.1. Efecto de la viscosidad del solvente sobre los parámetros cinéticos de estado estacionario

En el método de viscosidad se estudia el efecto de viscógenos, como la sacarosa o el glicerol sobre los parámetros cinéticos en estado estacionario. Eventos bimoléculares, como la disociación de productos son sensibles a la viscosidad del solvente. En cambio, la catálisis, un evento unimolecular no depende de la viscosidad del medio.

Existe una relación lineal entre la viscosidad relativa (cociente viscosidad del medio en presencia/ausencia de viscógeno) y el cociente de k_{cat} ausencia/presencia de viscógeno. La pendiente de la recta está dada por

$$\text{pend } k_{cat} = \frac{k_2}{k_2 + k_3} \qquad \text{ecuación 7}$$

Si el *turnover number* (k_{cat}) está determinado por la transferencia de fosfato se espera que sea independiente de la viscosidad (pendiente = 0); mientras que si el turnover está determinado por la liberación de producto se espera un efecto máximo de la viscosidad (pendiente = 1) (figura I.20).

Para la Cα el efecto de la viscosidad sobre el k_{cat} utilizando kemptido como sustrato es máximo (Adams, J.A. & Taylor, S.S., 1993).

El efecto de la viscosidad sobre la eficiencia catalítica da información acerca del paso de disociación del sustrato (k_{-1}). Al igual que lo que sucede con la k_{cat}, el cociente eficiencia catalítica en ausencia/presencia de viscógeno y la viscosidad relativa se relacionan linealmente. La pendiente de la recta está dada por

$$\text{pend } k_{cat}/K_m = \frac{k_2}{k_{-1} + k_2} \qquad \textbf{ecuación 8}$$

Una pendiente de valor 1 indica que la disociación del sustrato es mucho más lenta que la transferencia de fosfato, es decir que el sustrato es pegajoso (*sticky*), mientras que una pendiente de valor 0 indica que la tranferencia de fosfato es más lenta que la disociación de sustrato.

Tanto para el caso de k_{cat} como para el de k_{cat}/K_m valores de pendientes entre 0 y 1 indican que k_2 y k_3, y k_2 y k_{-1}, respectivamente, son similares.

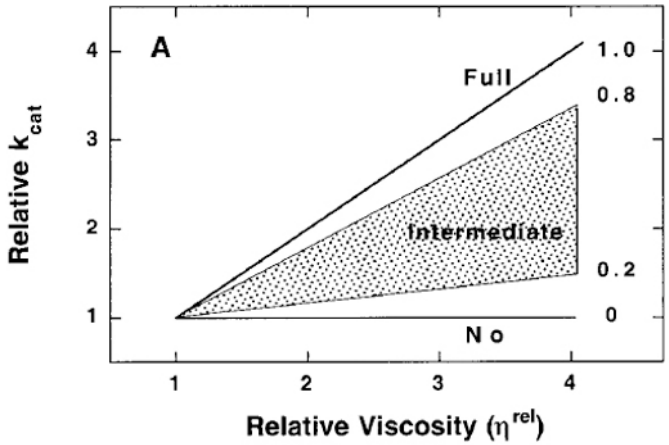


Figura I.20. (Adams, J.A., 2001) Gráfico del cociente de k_{cat} en función de la viscosidad relativa del solvente. Se muestran los posibles efectos: completo, intermedio y nulo y los valores que toman las pendientes en cada caso (sobre la derecha). Lo mismo se aplica al gráfico de los cocientes de las eficiencias catalíticas.

I.2.2.2. Cinética de estado pre-estacionario

También se puede seguir directamente la reacción a tiempos muy cortos correspondientes al estado pre-estacionario, utilizando un dispositivo de mezclado rápido automático (*rapid quench flow technique*). Esta técnica permitió aislar el paso de transferencia de fosfato. La kinasa y el [γ^{32}P]ATP colocados en una jeringa se combinan con el sustrato proteico en la primera cámara colocado en otra jeringa. Luego, a intervalos de tiempo pequeños la reacción se frena en una segunda cámara, antes de que la muestra sea analizada (figura I.21A).

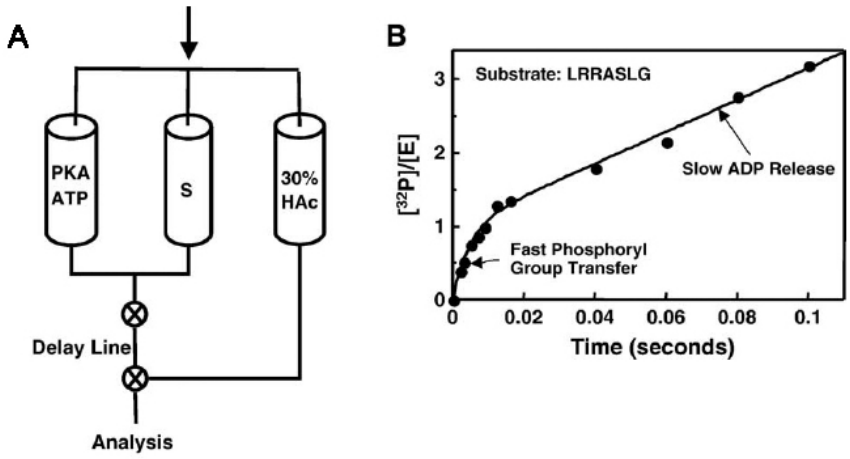


Figura I.21. (Lieser, S.A. et al., 2005) Técnica de mezclado rápido. A. Dispositivo. B. Cinética de estado pre-estacionario de la fosforilación del kémptido por subunidad Cα. Los datos están expresados como cantidad de γ^{32}P incorporado en función del tiempo.

A través de esta técnica se observó que la fosforilación del kemptido por parte de la subunidad Cα tiene un comportamiento bifásico con una fase rápida exponencial seguida de una fase lineal más lenta (figura I.21B). La fase inicial corresponde al paso de transferencia de fosfato, mientras que la fase lineal corresponde a la liberación de ADP. Este resultado está en concordancia con el efecto máximo de la viscosidad sobre la k_{cat}: es la liberación de ADP el paso limitante.

I.2.2.3. Modelo de *clamp*

Para varias quinasas se cumple que los péptidos derivados de las secuencias consenso tienen un valor de K_m mayor (afinidad aparente menor) y más parecidos a sus K_ds que los sustratos proteicos enteros. Esto indica que regiones por fuera del motivo consenso están participando en el reconocimiento del sustrato (Lieser, S.A. et al., 2005). Además la k_{cat} es mayor para los sustratos enteros que para los péptidos. Estas observaciones se pueden interpretar bajo el modelo de *clamp* (Lieser, S.A. et al., 2005), que propone que interacciones del sustrato y la enzima por fuera del sitio catalítico generan cambios conformacionales en esta última que aumenta la tasa de transferencia de fosfato (figura I.22). La transferencia de fosfato cuando el sustrato es un péptido es el paso

limitante. Cuando el sustrato es una proteína la transferencia de fosfato es más rápida y deja de ser el paso limitante, siendo ahora la liberación de ADP el paso que determina la velocidad de la reacción.

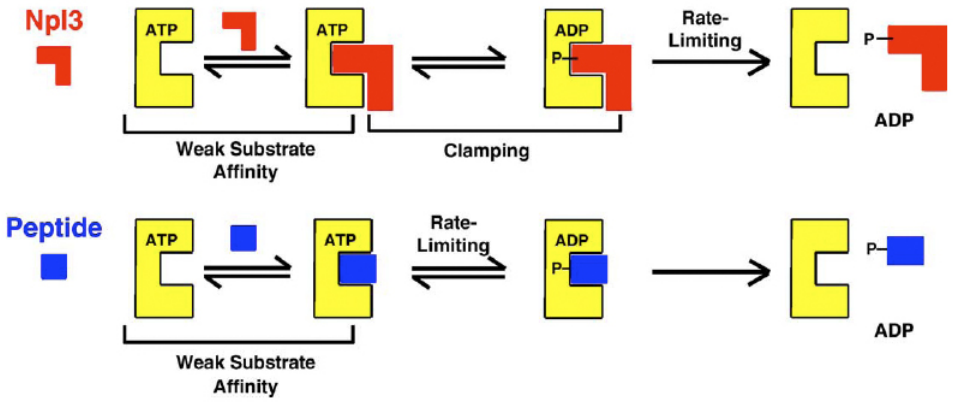


Figura I.22. (Lieser, S.A. et al., 2005) Modelo de *clamp*. Interacciones entre el sustrato y la quinasa por fuera del sitio activo no contribuyen grandemente a la afinidad sino que generan cambios conformacionales en la enzima que determinan una tasa de transferencia de fosfato rápida. En rojo está esquematizado Npl3, un sustrato de la quinasa Sky1p; en azul, el péptido correspondiente al sitio de fosforiación; en amarillo, la quinasa Sky1p.

I.3. CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

Para entender la función que cumplen las proteínas es necesario conocer su estructura tridimensional, es decir su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria. La resonancia magnética nuclear (RMN) y la cristalografía de rayos X son las dos técnicas que se utilizan actualmente para obtener la estructura tridimensional de una proteína con alta resolución. La cristalografía de rayos X es todavía la técnica dominante. Actualmente se conoce la estructura de unas 50.000 proteínas, de las cuales alrededor del 85% fueron resueltas por cristalografía de rayos X. En muchos casos funcionan como técnicas complementarias.

I.3.1. Fundamento de la técnica

No es posible ver los átomos y moléculas porque estos componentes de la materia son demasiado pequeños para ser vistos. Idealmente esto sería posible con un supermicroscopio. Sin embargo la resolución no sería lo suficientemente alta para ver átomos. Sólo se pueden observar los detalles de un objeto con un microscopio cuando esos detalles estén separados por al menos la mitad de la longitud de onda utilizada. La luz visible tiene longitud de onda de 4 a $8x10^{-5}$ cm y por lo tanto no nos permite ver átomos separados por distancias del orden de 10^{-8} cm (0,1 nm). La radiación apropiada para ver átomos es la radiación X, cuya longitud de onda está en el orden de los nanometros. Por lo tanto el supermicroscopio debería usar rayos X en lugar de luz visible. En un microscopio óptico o electrónico la radiación es dispersada por el objeto y recombinada por una lente. Desafortunadamente no se conocen lentes que puedan enfocar los rayos X. Por lo tanto el patrón de rayos X dispersado es directamente detectado y por este motivo las fases relativas de los rayos se pierden. El problema de las fases se resuelve emulando la lente por técnicas matemáticas. Si bien ocurre dispersión con todas las partículas cargadas, existe una relación inversa entre la intensidad emitida y el cuadrado de la masa, y por este motivo se considera sólo a los electrones y no a los núcleos como agentes dispersores. El resultado de la simulación matemática es por lo tanto un mapa de densidad electrónica.

La cristalografía de rayos X es un método de determinación de estructura molecular a partir de la difracción de rayos X de cristales (Glusker, J. P. et al., 1994). Un cristal es un arreglo tridimensional de moléculas, que se mantiene por uniones no covalentes. Los átomos se encuentran organizados de forma simétrica en celdas unitarias, que se repiten indefinidamente formando una estructura cristalina. La celda unitaria es el elemento mínimo representativo de todo el cristal (figura I.23). Un cristal suele tener la misma forma que su celda unitaria (Rhodes, G., 2005).

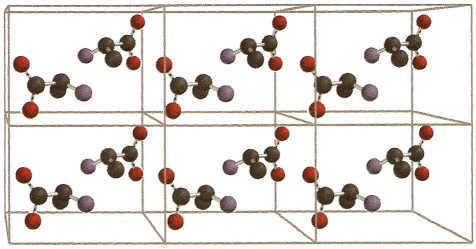


Figura I.23. Seis celdas unitarias. Cada una contiene dos moléculas de alanina (Rhodes, G., 2005).

La difracción ocurre cuando la radiación pasa a través de una apertura cuyas dimensiones son similares a la longitud de onda de la radiación. Como resultado se obtiene un patrón de claros y oscuros correspondientes a interferencias constructivas y destructivas. Los rayos X son difractados por las redes cristalinas, cuyas distancias interatómicas son del orden de la longitud de onda de la radiación incidente.

Aunque los átomos individuales difractan los rayos X no es posible producir una imagen enfocada de una molécula única por dos razones. Primero, como ya se ha mencionando, no existen lentes que enfoquen los rayos X. Este problema se resuelve midiendo la intensidad y la dirección de los rayos difractados y reconstruyendo la imagen a través de cálculos. Segundo, la intensidad de la radiación dispersada por una molécula única es muy débil. Un cristal contiene muchas moléculas ordenadas, en la misma orientación, de manera que la difracción generada por cada molécula es idéntica y se suma. Esto resulta en una señal lo suficientemente fuerte para ser detectada (Rhodes, G., 2005). Más aún, el hecho de que las proteínas estén formadas por átomos de bajo número atómico como carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno requiere una muy alta intensidad de radiación para poder detectar la difracción originada por sus cristales.

En un experimento de difracción un haz de radiación X incide sobre el cristal. La radiación dispersada es recogida por un detector (figura I.24).

I.3.2. Esquema general de trabajo

La determinación de la estructura de una proteína por cristalografía de rayos X consiste en los siguientes pasos: (1) obtención de la proteína purificada, (2) cristalización, (3) montado del cristal, (4) colección de las direcciones y de las intensidades de los rayos X difractados por el cristal y (5) procesamiento de los datos de difracción, (6) resolución de la estructura (7) refinamiento de la estructura y (8) validación de la estructura.

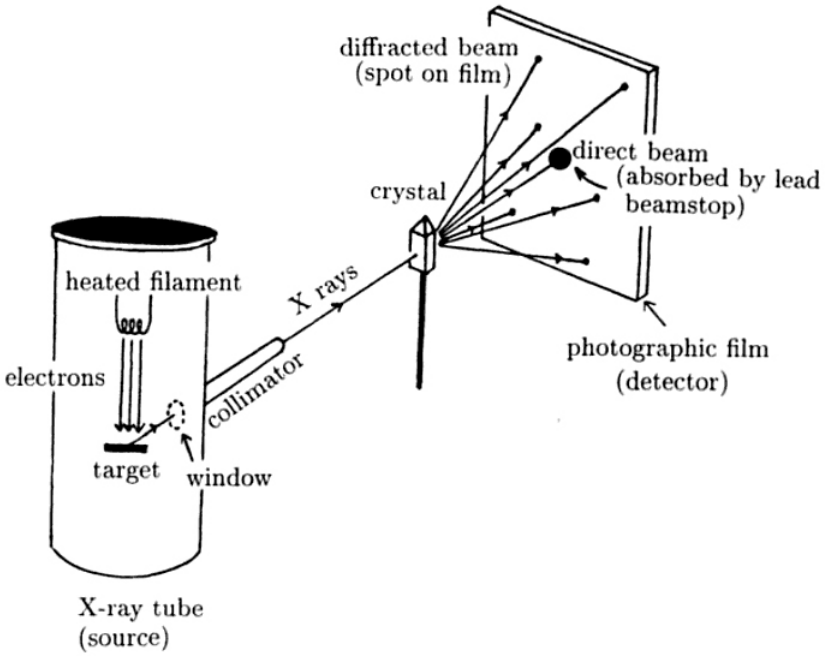


Figura I.24. Dispositivo experimental simplificado. Los elementos esenciales: son una fuente de rayos X, un cristal y un sistema de detección del patrón de difracción (Glusker, J. P. et al., 1994).

I.3.3. Obtención de la proteína purificada

La proteína a cristalizar puede obtenerse de dos fuentes. Las primeras proteínas resueltas por cristalografía fueron obtenidas del sitio de ocurrencia natural de la misma, por ejemplo lisozima a partir de la clara de huevo o un anticuerpo a partir de líquido ascítico. Actualmente se las obtiene a través de sistemas heterólogos de expresión de proteínas recombinantes. Los sistemas de expresión pueden ser bacterias, levaduras, células de insecto o de mamíferos.

Las proteínas se pueden purificar por solubilidad, tamaño, carga, afinidad a algún ligando natural o a través de proteína quimera fusionada a alguna “etiqueta” a través de técnicas convencionales como precipitación, desnaturalización y posterior replegado, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de afinidad, entre otras.

La proteína tiene que estar en altas concentraciones. Si bien la concentración requerida es diferente en cada caso, para muchas proteínas es de alrededor de 10 mg/ml. Por lo general, 10 mg de muestra son suficientes para explorar un gran número de condiciones de cristalización y obtener, cuando el proceso resulta exitoso, cristales de calidad para la resolución de las estructuras.

La preparación tiene que ser lo más homogénea posible (homogeneidad mayor al 95%).

I.3.4. Cristalización

La cristalización se define como el proceso por el cual se forma un sólido cristalino a partir de un gas, un líquido o una solución. En el caso de proteínas, el sólido en cuestión es un cristal de proteína (figura I.25) y el material de partida es la solución de alta concentración proteica.

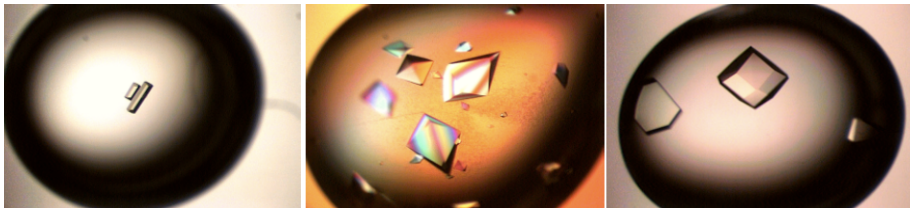


Figura I.25. Cristales de proteínas.

La cristalización de una proteína es un suceso empírico de prueba y error, y corresponde al paso menos comprendido de todo el proceso de resolución de una estructura. Esta etapa es hasta hoy el cuello de botella en la cristalografía de proteínas (Klinke, S., 2007).

Es imposible predecir las condiciones en las cuales una proteína cristaliza. Sin embargo, existen algunas condiciones generales: la concentración de la proteína debe ser cercana a la de saturación, el número de núcleos debe ser limitado para que los cristales puedan adquirir buen tamaño.

Los procedimientos llevados a cabo para cristalizar una proteína son por lo general notoriamente diferentes a los aplicados en sustancias inorgánicas o compuestos orgánicos de bajo PM. En estos últimos, el agregado de solventes volátiles o la evaporación por calentamiento de las soluciones son suficientes muchas veces para obtener cristales. Sin embargo, en el caso particular de las proteínas, las operaciones citadas no se aplican ya que resultan en su desnaturalización, lo que requiere un trabajo mucho más cuidadoso (Rhodes, G., 2005).

Los métodos de cristalización más importantes para proteínas y otras macromoléculas son diálisis, trabajo en *batch*, y difusión por vapor. En el primero, la solución proteica se dializa contra un buffer débil o simplemente agua. La disminución gradual de la fuerza iónica (efecto *salting in*) torna inestable a la proteína en solución, la cual puede precipitar o inclusive cristalizar para estabilizar sus cargas superficiales. Por otro lado, en el trabajo en *batch* se mezclan directamente la proteína y la solución de cristalización. La condición de sobresaturación se alcanza inmediatamente lo que puede inducir en el mejor caso a la formación de cristales. Por último, los métodos relacionados con la difusión de vapor son los más utilizados y por ese motivo se describen con más detalle a continuación (Klinke, S., 2007).

El fundamento principal del método de difusión por vapor es llegar a la condición de sobresaturación de la solución proteica de modo lento para favorecer los contactos ordenados entre moléculas de proteína con la formación de la menor cantidad posible de núcleos.

La proteína purificada se disuelve en un buffer que contiene un precipitante, como sulfato de amonio o polietilenglicol en concentraciones justo por debajo de la necesaria para precipitar la proteína. Luego el agua se evapora de forma lenta y controlada, aumentando de esta manera la concentración de proteína y de precipitante, lo cual resulta en la precipitación lenta de la proteína.

La precipitación de la proteína ocurre cuando la combinación de proteína y de precipitante excede los valores umbrales (figura I.26). La formación de cristales ocurre en dos etapas: nucleación y crecimiento. La nucleación, la formación inicial de *clusters* de moléculas a partir del cual el cristal crece requiere una concentración de proteína y de precipitante más alta que la óptima para la precipitación lenta. Si las condiciones de nucleación persisten, se formarán muchos cristales pequeños en lugar de pocos cristales grandes. Si, en cambio, la concentración de proteína decrece lo suficiente como para alcanzar las condiciones de crecimiento, los pocos cristales que comenzaron a formarse podrán crecer (Rhodes, G., 2005).

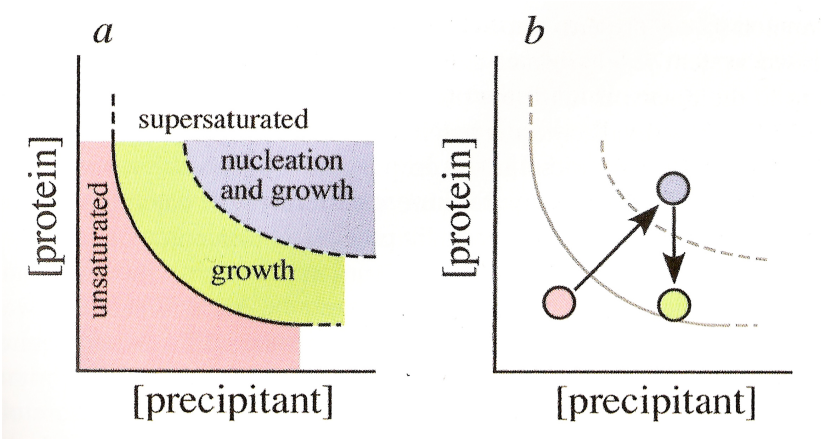


Figura I.26. (a) Diagrama de fases para la cristalización por difusión de vapor; (b) Estrategia ideal de cristalización (Rhodes, G., 2005).

En los métodos clásicos de difusión de vapor se mezclan cantidades iguales de solución proteica y de solución de cristalización (usualmente del orden de los microlitros) y se disponen en forma de gota colgante (*hanging drop*) o gota sentada (*sitting drop*) (figura I.27).

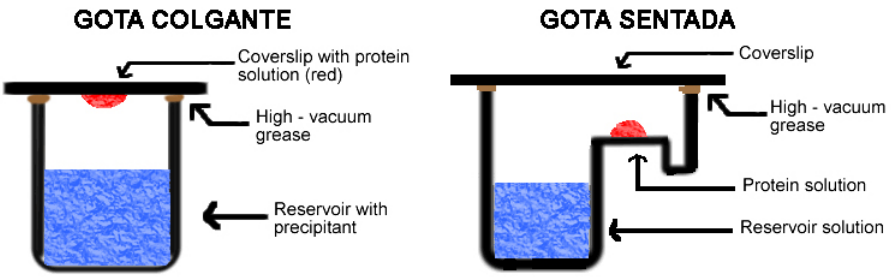


Figura I.27. Diagrama del método de gota colgante y de gota sentada.

La concentración de agente precipitante se elige de forma tal que al mezclarse con la proteína se llegue a una situación en la cual el sistema se halle dentro de la zona estable del diagrama de solubilidad. Luego se produce naturalmente difusión de vapor desde la gota hacia el reservorio inferior para igualar el potencial químico del agua en cada fase, lo que incrementa las concentraciones de precipitante y proteína en la gota (flecha diagonal en el esquema de la figura I.26b). Al arribar a la zona de nucleación se dan las condiciones termodinámicas para que los cristales puedan crecer (flecha descendente de la figura I.26b) y llevar nuevamente a la condición de estabilidad (Klinke, S., 2007).

La ventaja principal del método de gota colgante respecto al de gota sentada es que existe menor probabilidad de que los cristales formados se adhieran a la superficie donde reside la gota, además de la posibilidad de manipular cada una de ellas de forma independiente y con mayor facilidad (Klinke, S., 2007).

Para explorar un número importante de diversas condiciones de cristalización, muchas empresas ofrecen *kits* comerciales para este fin. Estos constan de decenas a centenas de diferentes formulaciones que resultaron exitosas en el pasado para cristalizar a otras proteínas. La gran mayoría de las soluciones contiene sulfato de amonio o polietilenglicol (PEG) de variados pesos moleculares como agente precipitante. Las mismas se complementan con soluciones buffer de distintos componentes y pHs y con el agregado de aditivos. Existen también sistemas automatizados, que consisten en placas de 96 pequeñas camaritas como las de la figura I.27 y un robot que mezcla la solución de proteína con la solución precipitante y arma las gotitas (figura I.28). Actualmente en los proyectos de cristalización de genomas el montado de cristales está también automatizado.

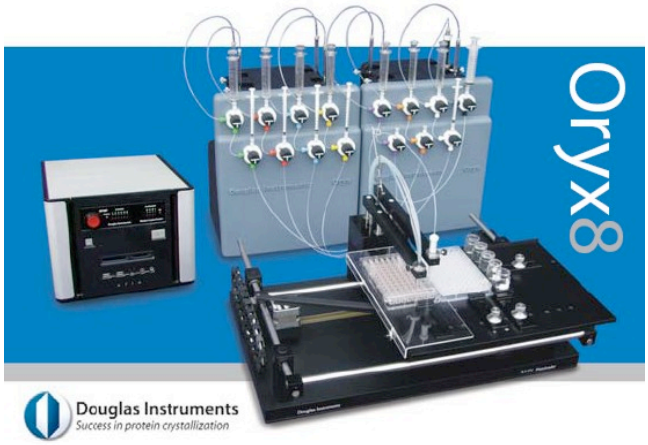


Figura I.28. Robot de cristalización automática.

Por lo general, los cristales obtenidos mediante estos kits son de calidad o tamaño insuficientes para resolver las estructuras. Por este motivo, estas condiciones iniciales deben ser optimizadas preparando nuevas formulaciones en donde se varíen convenientemente uno o varios de los componentes de las soluciones de cristalización (Klinke, S., 2007).

I.3.5. Montado de cristales

El paso siguiente a la obtención de los cristales de la proteína en estudio consiste en ubicarlos de forma adecuada en el equipo de difracción para ser incididos por rayos X. Para ello existen dos métodos según la colección de datos se realice a temperatura ambiente o en condiciones criogénicas.

Actualmente se prefiere trabajar en condiciones de criocristalografía salvo casos particulares. Esta variante tiene tres ventajas fundamentales. El daño por radiación es notoriamente menor, ya que los radicales libres dañinos que se originan al incidir los cristales con radiación X presentan una capacidad de difusión muy limitada. Esto permite colectar comúnmente sets de datos completos con un único cristal. Las bajas temperaturas reducen la movilidad de las moléculas, lo que deriva en mapas de densidad electrónica más claros y definidos. La manipulación de las muestras es mucho más simple y directa (Rhodes, G., 2005).

La toma de datos a bajas temperaturas requiere que los cristales sean atrapados por tensión superficial en pequeños crio-lazos (*loops*) en donde un flujo de nitrógeno a 100K impacta directamente sobre el cristal montado en el equipo (figura I.29). Para este método es necesario realizar inmersión previa del cristal en una solución crioprotectora, la cual está compuesta en general por la solución de cristalización adicionada con glicerol o PEG 400, evitándose así la formación de hielo cristalino en el *loop* al enfriar. El hielo (agua) dificulta el análisis posterior ya que

genera una señal de difracción de fondo muy fuerte, observándose anillos característicos superpuestos a la señal proteica (figura I.30) (Klinke, S., 2007).

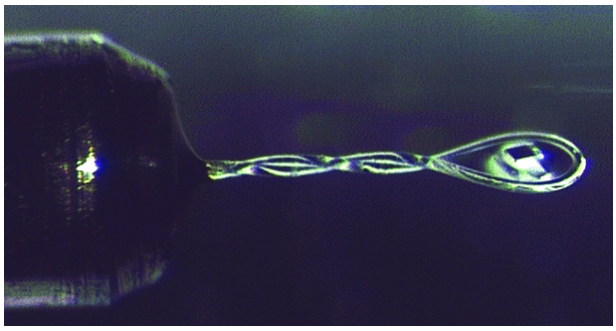


Figura I.29. Cristal montado en un *loop*.

I.3.6. Colección de datos

I.3.6.1. Generalidades de un equipo de difracción de macromoléculas

En líneas generales, los equipos utilizados para la colección de datos de difracción de macromoléculas constan de una fuente de rayos X, un colimador para estrechar el haz de rayos X, un sistema de monocromatización del haz, un goniómetro para controlar la orientación y oscilación del cristal durante la colección y un sistema de detección de rayos X. Estas partes del equipo se encuentran gobernadas por una computadora que se encarga además de almacenar las imágenes de los patrones de difracción (*frames*) (figura I.30) obtenidos para su posterior análisis (Klinke, S., 2007).

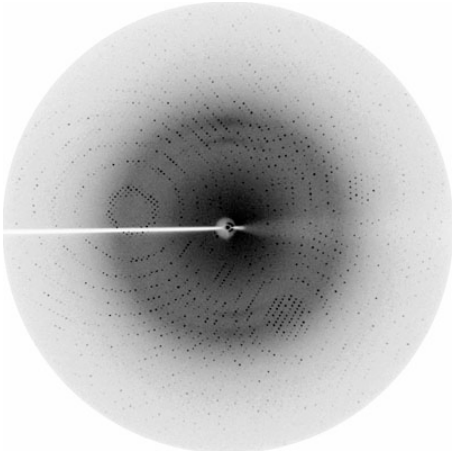


Figura I.30. Imagen de difracción. Los anillos que se observan corresponden a la difracción del agua. Los puntos son las reflexiones producidas por la difracción de los rayos X por el cristal de proteína.

Las fuentes de rayos X más utilizadas en cristalografía de proteínas son los generadores de ánodo rotatorio y las estaciones de sincrotrón. Los primeros (figura I.31) están formados básicamente por

un filamento (cátodo) por el cual se hace pasar una elevada corriente eléctrica y que se encuentra a un marcado potencial negativo respecto de un bloque giratorio de cobre, cromo o molibdeno (ánodo rotatorio). La diferencia de potencial origina una corriente de electrones proveniente del filamento que impacta en el ánodo generándose rayos X. Como en cristalografía de proteínas interesa solamente la radiación monocromática es necesario instalar un sistema de monocromatización eficiente a la salida del haz. Una de las radiaciones más utilizadas corresponde a la denominada linea K_α de cobre, la cual posee una longitud de onda característica de 1,542 Å (Klinke, S., 2007; Rhodes, G., 2005). Los equipos de ánodo rotatorio son muy convenientes para el estudio de cristales de proteínas aunque la intensidad de la radiación generada por ellos resulta a veces insuficiente, requiriéndose el uso de generadores más potentes como las estaciones sincrotrón, como se detalla a continuación.

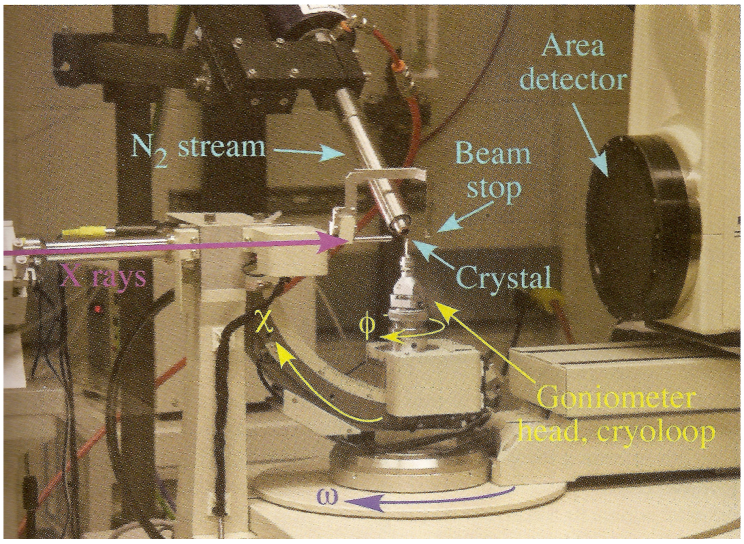


Figura I.31. Equipo de difracción. La fuente de rayos X, el ánodo rotario, no se muestra en la figura. Está a la izquerda del colimador. El detector a la derecha captura las reflexiones. El cristal se mantiene a bajas temperaturas a través de un chorro de nitrógeno líquido. El goniómetro, permite posicionar y rotar de forma controlada el cristal (Rhodes, G., 2005).

Los sincrotrones (figura I.32) son estaciones experimentales muy complejas capaces de generar una radiación X de muy alta intensidad y elevado grado de focalización. Están formados básicamente por un anillo poligonal de gran diámetro (decenas a centenas de metros) por el cual circulan partículas elementales cargadas (electrones y positrones) a velocidad cercanas a la de la luz. En cada vértice del anillo se ubican imanes capaces de modificar la dirección de las partículas almacenadas en el mismo. Este cambio en la trayectoria genera emisión de un continuo de radiación desde la zona del espectro electromagnético correspondiente a los rayos X hasta la región del infrarrojo. La intensidad de la radiación originada en estos aceleradores de partículas es algunos órdenes de magnitud superior a la obtenida en generadores de ánodo rotatorio. Esto permite reducir el tiempo necesario para la colección de un set de datos completo de difracción a

unas pocas horas o incluso a minutos en los sincrotrones de última generación (Klinke, S., 2007; Rhodes, G., 2005).

Figura I.32. Foto aérea del exterior del sincrotrón (izquierda) y esquema del interior (derecha).

Los detectores de rayos X más modernos que se utilizan en cristalografía de proteínas son capaces de cuantificar la radiación dispersada en una superficie bidimensional y por este motivo se los conoce con el nombre general de detectores de área. Los tres miembros más conocidos de esta familia corresponden a los detectores de tipo *multi-wire*, *image plate* y *charge-coupled devide* (Rhodes, G., 2005).

I.3.6.2. Celda unitaria

Los cristales son arreglos periódicos tridimensionales de átomos, iones o moléculas que adoptan un determinado empaquetamiento para minimizar su energía libre. Desde un punto de vista formal se los puede considerar como el producto de la repetición traslacional de una unidad mínima conocida como celda unitaria, caracterizada por tres vectores de red (**a**, **b**, **c**) y tres ángulos (α, β, γ) (figura I.33). A estos parámetros se los conoce en conjunto como las dimensiones de la celda unitaria (Rhodes, G., 2005).

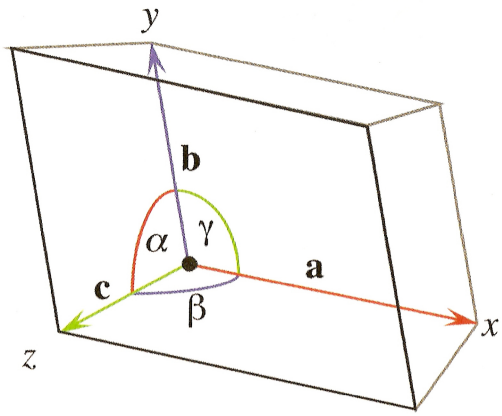


Figura I.33. Celda unitaria. Se muestran los lados **a**, **b** y **c** y los ángulos α, β y γ (Rhodes, G., 2005).

Las relaciones entre los valores que adoptan los vectores **a**, **b** y **c** y los ángulos α, β y γ se encuentran muchas veces restringidas por la simetría existente entre las moléculas, dando lugar a

los siete sistemas cristalinos: triclínico, monoclínico, ortorrómbico, tetragonal, cúbico, trigonal y hexagonal (Klinke, S., 2007).

I.3.6.3. Indices de Miller

En cristalografía es muy utilizado el concepto de planos reticulares, es decir, aquellos que atraviesan los orígenes o nodos de las celdas unitarias del cristal. Esto es así debido a que el fenómeno de difracción puede ser entendido como reflexiones del haz de rayos X contra los planos en la llamada interpretación de Bragg (Klinke, S., 2007).

Estos planos se encuentran caracterizados por tres índices *h, k, l* llamados índices de Miller (figura I.34). Representan el número de veces que el plano divide a la celda unitaria en las tres direcciones *x*, *y*, *z*, respectivamente. Más específicamente, el trío *hkl* define a una familia de planos paralelos equiespaciados por una distancia *d* en el cristal (Klinke, S., 2007).

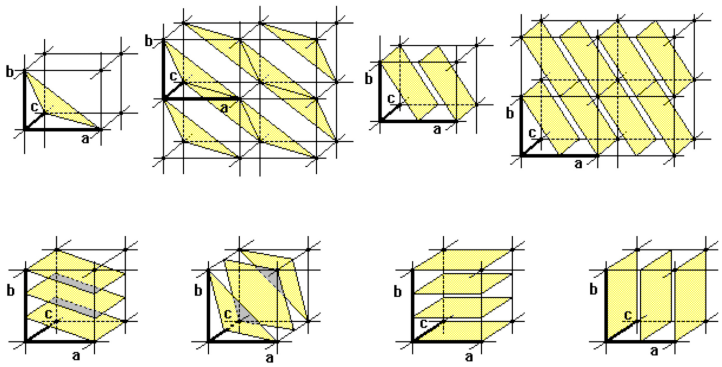


Figura I.34. Los índices de Miller (*h*, *k*, *l*) representan planos.

I.3.6.4. De las reflexiones a la densidad electrónica

Cada reflexión de la imagen se origina de un grupo de planos de acuerdo a la ley de Bragg.

Los factores de estructura son magnitudes vectoriales, que se relacionan matemáticamente con la distribución de la densidad electrónica dentro de la celda unitaria a través de la transformada de Fourier. Cada reflexión (*h*, *k*, *l*) medida por difracción de rayos X da origen a un factor de estructura (*h*, *k*, *l*). La intensidad de las reflexiones es proporcional al cuadrado del módulo o amplitud de los factores de estructura. Adicionalmente al módulo, el factor de estructura posee una fase (φ) incapaz de ser medida experimentalmente (problema de las fases).

I.3.6.5. Red recíproca. Construcción de Ewald

Existe una construcción matemática muy útil para entender la geometría de la difracción cristalina que comprende la definición de una red asociada a la red cristalina o directa llamada red recíproca. La misma se formaliza a través de tres vectores **a***, **b*** y **c*** (Klinke, S., 2007).

En celdas directas que poseen ángulos de 90° se deriva que el módulo de **a*** es la inversa del módulo de **a**, y lo mismo para el resto de los vectores, de allí el origen de la reciprocidad. La mayor utilidad de la red recíproca es que permite determinar fácilmente las direcciones de difracción cristalina a través de la llamada construcción de Ewald (figura I.35) (Klinke, S., 2007).

El objetivo fundamental de la colección de datos es lograr ubicar en condición de difracción a la mayor cantidad de puntos de la red recíproca, o lo que es similar, cubrir el mayor porcentaje del espacio recíproco midiendo en todos los casos las intensidades de las reflexiones observadas. Como se puede ver en la figura, sólo unos pocos puntos de la red recíproca están en contacto con la circunferencia (o esfera en el caso tridimensional) para una dada orientación del cristal. Para colocar al resto de los puntos en condición de difracción es necesario rotar el cristal durante la colección de datos. La red recíproca gira solidariamente con el cristal y de ese modo otros puntos atraviesan la esfera de Ewald (Klinke, S., 2007).

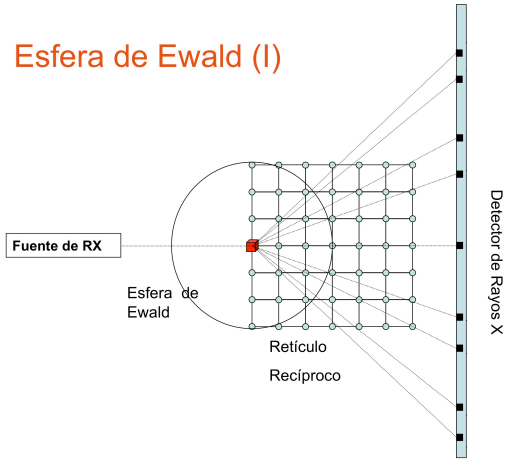


Figura I.35. Representación bidimensional de la construcción de Ewald. El cristal se ubica en el centro de la circunferencia de radio 1/λ, es incidido por el haz de rayos X y el cual es dispersado. Cuando un punto de la red recíproca toca la circunferencia de Ewald, se observa un máximo de difracción.

Como observación final, la simetría presente en los cristales hace que muchas veces puntos distintos de la red recíproca sean equivalentes desde el punto de vista del fenómeno de difracción. Esto es muy favorable ya que se reduce notoriamente la cantidad de reflexiones que necesitan ser medidas para obtener un *set* de datos de alta complejidad (Klinke, S., 2007).

I.3.7. Procesamiento de datos

El procesamiento de datos consiste en poner toda la información colectada en las diferentes imágenes (en dos dimensiones) en un solo archivo de datos que contenga la información de las reflexiones en el espacio.

Consta de tres etapas: indexación (*index*), integración (*integration*) y escalado (*scaling*). La indexación es la asignación para cada reflexión de sus índices de Miller como así también la determinación de los parámetros de la celda unitaria y el grupo espacial del cristal en estudio. Para la indexación se necesitan unos pocos *frames*. El número depende de la simetría del cristal. La posición de las reflexiones está determinada por el sistema cristalino y las dimensiones de la celda unitaria, es decir está determinada por la ley de Bragg. En cambio la intensidad de las reflexiones está determinada por la estructura de la molécula, es decir por la transformada de Fourier.

Un juego completo de datos incluye muchas imágenes o *frames* (en dos dimensiones) en diferentes orientaciones. La integración consiste en la digitalización de las intensidades medidas para cada refexión, integrando todos los archivos provenientes de cada una de las imágenes en un único archivo, de acuerdo a la orientación de cada imagen. Debido a la variabilidad del poder difractor de los cristales, la diferencia en el recorrido del haz de rayos X en las diferentes orientaciones y la intensidad propia del haz, la intensidades de las reflexiones no son consistentes entre las diferentes imágenes. El proceso por el cual se ponen en una misma escala las reflexiones de diferentes imágenes se llama escalado.

I.3.8. Resolución de la estructura

El cálculo de fases que permite el cómputo de la densidad electrónica se conoce con el nombre de resolución de la estructura. En macromoléculas existen básicamente tres métodos para alcanzar este objetivo: reemplazo isoformo múltiple, dispersión anómala a varias longitudes de onda y reemplazo molecular (MR) (Klinke, S., 2007). De todos ellos se presentará a este último, ya que fue el método utilizado para resolver la estructura presentada en esta tesis.

En el método de reemplazo molecular la estructura puede resolverse con los datos de difracción de los cristales nativos y con un modelo molecular previamente resuelto. El modelo de partida debe ser relativamente parecido a la estructura problema: se requiere en general al menos un 30-40% de identidad de secuencia. El fundamento de MR es el siguiente: si las estructuras problema y modelo son semejantes, lo mismo ocurrirá con las fases de los factores de estructura de la reflexiones de ambas. Estas fases son las que se utilizan luego para resolver la molécula problema (Klinke, S., 2007).

Los factores de estructura del modelo (F_c, por calculados) son fácilmente obtenibles, pudiéndose computar tanto sus módulos como sus fases. Dichos valores dependen fuertemente de la orientación y la ubicación del modelo en la celda unitaria. El objetivo de MR es justamente orientar y ubicar al modelo en la unidad asimétrica de la estructura problema de forma tal que los módulos de F_c se asemejen lo más posible a los módulos de los factores de estructura de la molécula problema (F_o, por observados) y que fueron medidos en la colección de datos (Klinke, S., 2007). El último paso de MR consiste en el refinamiento de cuerpo rígido o *fitting* del modelo ya orientado. Se obtiene como resultado final del reemplazo un conjunto de coordenadas ubicadas convenientemente en la celda unitaria a partir de las cuales se calculan fases iniciales (φ_c) para comenzar a trabajar en la obtención de la estructura final (Klinke, S., 2007).

Este método tiene la desventaja de generar un sesgo hacia el modelo de partida (*model bias*) debido a que las fases calculadas provenientes del modelo conocido poseen mucha influencia en el resultado final de los módulos de F_o. Por esto conviene muchas veces modificar adecuadamente las coordenadas de partida para minimizar las diferencias con la estructura problema. Esto se hace eliminando zonas de baja identidad de secuencia y mutando a alaninas a aquellos residuos no coincidentes entre ambas estructuras, generándose así modelos de búsqueda mejorados (Klinke, S., 2007).

Como comentario final, existen casos más complicados en MR en donde por ejemplo aparece más de una copia del modelo de búsqueda en la unidad asimétrica, como ocurrió en la resolución de estructura que se presenta en esta tesis.

I.3.9. Refinamiento

Una vez obtenidas las fases calculadas (φ_c) a partir de alguno de los métodos de resolución nombrados con anterioridad, se trabaja con dos mapas de densidades electrónicas: de simple diferencia de Fourier (F_o-F_c), y doble diferencia de Fourier ($2F_o$-F_c) (Klinke, S., 2007).

El mapa F_o-F_c muestra picos positivos en aquellas posiciones del espacio en donde el modelo necesita ser complementado para arribar a la estructura problema, y picos negativos en aquellos lugares donde hay modelo en exceso. Por otro lado, el mapa $2F_o$-F_c presenta señal clara tanto en zonas modeladas correctamente como en aquellas en donde es necesario modelar todavía. Ambos mapas son utilizados conjuntamente para completar y corregir el modelo de acuerdo a la secuencia aminoacídica de la proteína problema, proceso conocido como *model building*. Los mapas de densidades son funciones que están definidas de R^3 a R, por lo que su representación completa requeriría cuatro dimensiones. Por este motivo se trabaja con superficies de isofunción en ambos

casos, observándose las características tuberías de densidad electrónica de valor constante (figura I.36) (Klinke, S., 2007).

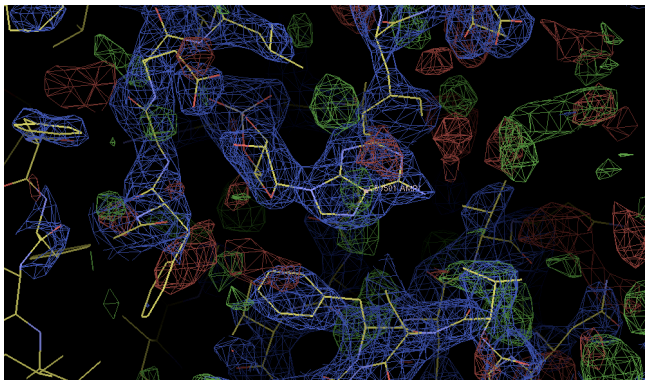


Figura I.36. Las coordenadas de Bcy1 en las etapas iniciales de la resolución de estructura se muestran como *sticks*. En azul se muestra el mapa de densidad electrónica $2F_o$-F_c y en verde (picos positivos) y rojo (picos negativos) el mapa de densidad electrónica $2F_o$-F_c (Coot).

Una vez finalizado este primer ciclo de modelado visual se da lugar al refinamiento matemático de la estructura. En términos generales se puede definir a este proceso como un ajuste del modelo para que exista un máximo acercamiento entre los valores calculados y observados de los módulos de los factores de estructura. A su vez, el desplazamiento de los átomos en el refinamiento se halla fuertemente condicionado por penalidades de geometría como planaridad de anillos aromáticos, quiralidad, distancias y ángulos de enlace entre otros. En este sentido, la estructura a ser refinada debe presentar valores semejantes a los presentes en la bibliografía (Klinke, S., 2007).

La salida del refinamiento matemático corresponde a coordenadas refinadas a partir de las cuales se pueden calcular nuevos conjuntos de φ_c, módulos de F_c y mapas simple y doble diferencia de Fourier. Estos son sometidos nuevamente a modelado visual, y el proceso se continúa hasta alcanzar convergencia y la mayor completitud posible para el modelo final. El refinamiento se monitorea por medio del factor R, el cual debe presentar un descenso progresivo a medida que avanzan los ciclos. Una estructura proteica correctamente resuelta y refinada debería presentar un valor no muy superior a R = 0,20-0,25, aunque el valor final depende de la resolución de los datos cristalográficos entre otros factores. Adicionalmente se calcula un estadístico denominado factor R libre (R_{free}) utilizando un pequeño porcentaje de reflexiones que no se incluyeron en el proceso de resolución y refinamiento de la estructura. Este razonamiento, conocido en cristalografía con el nombre de validación cruzada, permite detectar falencias por modelado excesivo o erróneo en las estructuras. Si se trabaja correctamente, el R_{free} debe disminuir conjuntamente con el R durante el refinamiento y no ser más de 0,06 unidades mayor que este último para el modelo final (Klinke, S., 2007).

Es importante aclarar que existen distintas variantes de refinamiento y que cada una de ellas se aplica en diferentes instancias. Por lo general se comienza con un refinamiento de cuerpo rígido, permitiendo que las coordenadas atómicas se muevan únicamente en bloques. Luego se suelen llevar a cabo uno o varios ciclos del proceso denominado templado simulado (*simulated annealing*). La finalidad del mismo es realizar dinámica molecular evitando mínimos locales energéticos por medio de un calentamiento hipotético de la estructura y posterior enfriamiento gradual. El templado simulado es muy recomendado en los primeros ciclos de refinamiento ya que permite grandes desplazamientos de las cadenas principales para ajustar el modelo a las reflexiones experimentales, siendo poco útil o inclusive perjudicial en las etapas finales. Más adelante se refina para cada átomo no sólo su posición, sino también un cuarto parámetro denominado factor térmico isotrópico o factor B. Este último refleja la movilidad del átomo en la estructura cristalina, observándose densidad electrónica débil o difusa para valores elevados del mismo (Klinke, S., 2007).

I.3.10. Validación

Por último, las estructuras requieren ser validadas. El proceso de validación tiene por objetivo detectar errores durante la resolución y el refinamiento, como así también determinar la calidad del modelo final en base a un conjunto de estadísticos y otros parámetros adecuados. Para ello se comparan los resultados obtenidos en los modelos experimentales contra los esperados a partir de una base de datos de estructuras a alta resolución (Klinke, S., 2007).

Como ya se ha mencionado los parámetros R y R_{free} son una medida de la bondad de ajuste del modelo a los datos experimentales. Otro aspecto importante a tener en cuenta es la geometría de la molécula, en especial los ángulos φ y ψ (gráfico de Ramachandran) (Rhodes, G., 2005).

La resolución de la estructura, al igual que para la microscopía, indica cuál es la distancia mínima entre dos puntos que puede ser distinguida (Rhodes, G., 2005).

Como se mencionó anteriormente, la indeterminación en la posición de los átomos puede deberse a movimientos térmicos o al desorden. Los movimientos térmicos se refieren a vibraciones de un átomo alrededor de su posición de reposo. El desorden se refiere a un átomo o grupo de átomos que no ocupan la misma posición en todas las celdas unitarias. El factor de temperatura B, que se obtiene durante el refinamiento refleja tanto el movimiento térmico como el desorden, haciendo difícil identificar la causa de la indeterminación (Rhodes, G., 2005).

I.4. OBJETIVOS GENERALES

Como ya se mencionó en las páginas anteriores mucho se conoce acerca de la PKA de mamíferos, la cual ha sido considerada como prototipo de PKA. Existen en la literatura numerosos trabajos en donde se comparan los polípéptidos que la componen dentro de un grupo más abarcativo: la subunidad C con otras quinasas; la subunidad R con otras proteínas que unen cAMP. No sabemos en realidad cuáles de las características de las proteínas descriptas son generales (de PKA) o cuáles son particularidades. Si bien muchas veces para responder preguntas es esencial utilizar un modelo bien caracterizado, el estudio de otros modelos alternativos aporta a la construcción de conceptos más universales.

Nuestro y otros laboratorios han contribuído a la caracterización de la PKA en dos modelos fúngicos: la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, modelo muy utilizado en el estudio de transducción de señales y el hongo filamentoso *Mucor rouxii* y su pariente *Mucor circinelloides*. La PKA de *Mucor sp.* tiene ciertas particularidades bioquímicas que la hacen un buen modelo para el estudio del mecanismo de activación.

Esta tesis está concentrada en el estudio bioinformático, bioquímico y estructural de la subunidad R en modelos fúngicos. En esta tesis se trabajó con los dos modelos del laboratorio e incluso se incursionó con otro sistema, el de *Neurospora crassa*. Se intentó dar una mirada global, concentrándonos en aquellas características que se conservan.

El trabajo está atravesado por un análisis bioinformático en el cual se comparan secuencias de la subunidad R de diferentes hongos. El objetivo de este análisis, descripto en el capítulo II fue identificar los elementos generales y las particularidades de cada sistema. En esta parte de la tesis nos preguntamos qué dominios están presentes en la secuencia de las subunidades R de hongos, qué regiones de las secuencias de la subunidad R se conservan y cuáles no y si existe alguna marca distintiva de las subunidades R de hongos.

Como ya se describió, las subunidades R de mamíferos tienen en su extremo N-terminal un dominio de dimerización y anclaje (D/D), a través del cual las subunidades R se unen entre sí y a otras proteínas llamadas AKAPs. Una de las predicciones que surgió del análisis bioinformático fue que algunas subunidades R tienen dominio D/D y otras no. Otro objetivo del trabajo fue verificar bioquímicamente esta predicción (capitulo III).

La afinidad entre la subunidad C y la R varía de especie en especie. La afinidad R-C en *S.cerevisiae* es menor que en el sistema de mamíferos (Kuret, J. et al., 1988). Como se ha mencionado la PKA de *Mucor* tiene la particularidad de requerir sales o policationes, además de

cAMP para su disociación. Teniendo en cuenta estas observaciones y la gran variabilidad del *linker I* (ver apartado I.1.4.2.2), nos preguntamos si esta región de la zona bisagra participa en la interacción con la subunidad C y si puede explicar las diferencias en la interacción R-C entre especies. Finalmente nos preguntamos acerca del efecto de dicha interacción sobre la actividad de la PKA. Estas preguntas se abordaron en el capitulo IV con una aproximación de cinética enzimática.

Uno de objetivos actuales del laboratorio es avanzar en la caracterización estructural de la PKA en *S.cerevisiae*. Como ya se mencionó la única estructura conocida de este sistema es la de Tpk1, una de las tres subunidades C (ver apartado I.1.5). El objetivo del capítulo V fue la obtención de la estructura cristalina de Bcy1.

CAPITULO II:
ANALISIS BIOINFORMATICO DE LAS SUBUNIDADES REGULATORIAS DE HONGOS

II.1. Introducción y objetivos específicos

Se conoce poco acerca de la bioquímica y de la biofísíca de la PKA de hongos. Sin embargo se dispone de la secuencia aminoacídica de los polipéptidos que la componen de un número importante de hongos. El análisis y la comparación de las secuencias es un primer paso que suele dar información útil sobre el funcionamiento de las proteínas. Se ha observado en muchas ocasiones que la conservación de secuencia tiene implicancias funcionales.

Cuando se comenzaron a estudiar las subunidades R de hongos se creía que eran subunidades R de tipo II, pues tienen una Ser en el IS. La comparación de secuencias permitió evidenciar que las subunidades R de hongos constituyen un tipo subunidades R diferente de RI y de RII (Canaves, J.M. & Taylor, S.S., 2002).

El objetivo de esta parte de la tesis fue extraer información de la comparación de las secuencias de las subunidades R de hongos. Las preguntas que nos hicimos fueron las siguientes:

- ¿Qué dominios están presentes en la secuencia de las subunidades R de hongos?
- ¿Qué regiones de las secuencias de la subunidad R se conservan?
- ¿En qué se diferencian las secuencias de las subunidades R de hongos de las de mamíferos?
- ¿Es posible que los dominios D/D tengan una estructura similar a la de los mamíferos?

Para contestar estas preguntas se realizó un análisis bioinformático que consistió en la colección de secuencias de subunidades R de hongos y de mamíferos, la predicción de dominios conservados, el alineamiento múltiple y el alineamiento jerárquico de las secuencias y finalmente, la predicción de la estructura secundaria y el modelado por homología de los dominios D/D.

II.2. Resultados

II.2.1. Colección de secuencias

Se colectaron secuencias de subunidades R de mamíferos y de hongos de *National Institute of Health GenBank* utilizando el programa PSI-Blast. Se tomó como secuencia de partida la secuencia de la subunidad R de *Saccharomyces cerevisiae*, Bcy1. Se descartaron las secuencias redundantes. Se obtuvieron 40 secuencias de hongos y 65 de mamíferos, de las cuales 30 eran RI y 35 eran RII.

De acuerdo a la clasificación más moderna (Hibbett, D.S. et al., 2007) los hongos se dividen en cuatro *Fili*: Blastocladiomycota, Glomeromycota, Basidiomycota y Ascomycota. Los Basidiomycetes y los Ascomycetes forman el subreino Dikarya. Ambos grupos presentan cuerpo fructífero y son los grupos más conocidos y más abundantes. El *Filum* Basidiomycota está dividido en dos *Subfili*: Ustilagomycotina y Agaromycotina. El *Filum* Ascomycota está dividido en tres *Subfili*: Taphrinomycotina, Saccharomycotina y Pezizomycotina (figura II.1).

La gran mayoría de las secuencias colectadas (32) pertenece al *Filum* Ascomycota (figura II.1).

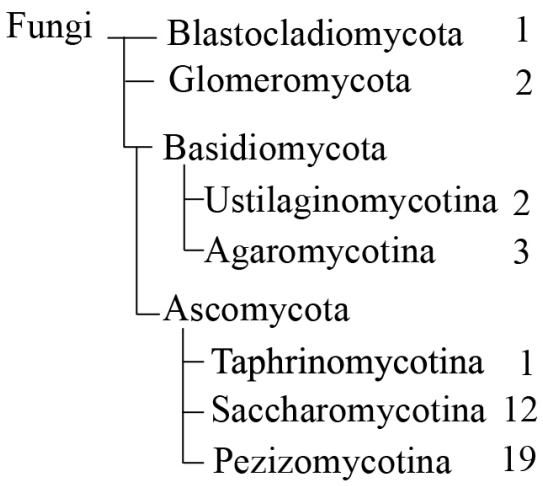


Figura II.1. Clasificación general de los hongos. Los números a la derecha indican la cantidad de secuencias colectadas de cada grupo.

II.2.2. Predicción de dominios

Se sometieron a las 40 secuencias de hongos al programa de predicción de dominios conservados SMART con el fin de averiguar qué dominios están presentes en las secuencias de hongos. Este programa también identifica regiones de baja complejidad. Las regiones de baja complejidad son secuencias con una composición sesgada de aminoácidos. Son en general regiones no globulares

y en algunos casos pueden participar en la transición de estructura desordenada a ordenada como ocurre con regiones que participan en interacciones proteína-proteína (Wright P.E. & Dyson, H.J., 1999).

Todas las secuencias presentaron los dominios CNB en tandem en el extremo C-terminal (figura II.2).

El dominio D/D se encontró sólo en 21 de las 40 secuencias. Las otras 19, todas ellas pertenecientes al *Subfilum* Pezizomycotina de los Ascomycetes carecen de dicho dominio (figura II.2). La ausencia de dominios D/D podría deberse a que la secuencias depositadas en el banco de datos no estén completas. Sin embargo, para varias de estas secuencias se encontró en la literatura evidencias (tales como identificación y estudio de funcionamiento de las regiones promotoras) que demuestran que las secuencias están completas. Por otro lado el hecho de que todas las secuencias correspondan a organismos del mismo grupo hace pensar que es una característica de las subunidades R y no una simple parcialidad de la información.

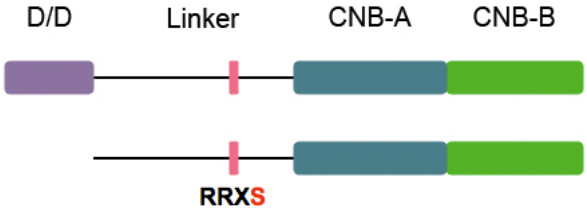


Figura II.2. Esquema que representa los dos grupos de secuencias de subunidades R de hongos que se encontraron: aquellas que incluyen dominio D/D y aquellas que no.

Todas las secuencias presentaron regiones de baja complejidad en la región correspondiente a la zona bisagra. Son más abundantes en el *linker I* (figura II.3). Esto nos hace pensar que el *linker I*, podría participar en la interacción con otras proteínas, en especial con la subunidad C.

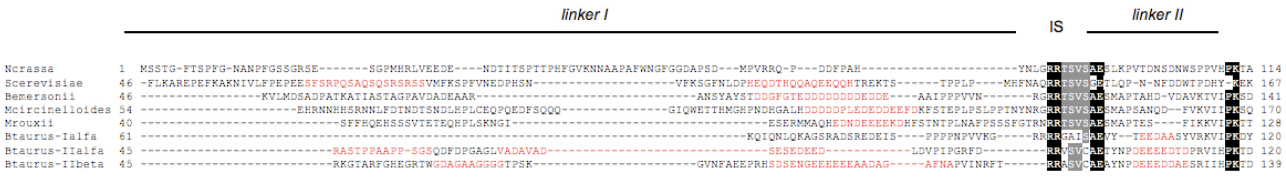


Figura II.3. Algunos ejemplos de secuencias con zonas de baja complejidad (en rojo) en la región *linker*.

II.2.3. Predicción de estructura secundaria de la región correspondiente al dominio D/D

Para aquellas secuencias a las que se les encontró el dominio D/D se realizó una predicción de estructura secundaria. En todos los casos se predijeron dos α-hélices separadas por una Pro central (figura II.4). Esta predicción coincide con las estructuras resueltas de los dominios D/D de las subunidades RI y RII de mamíferos. La hélice II en la predicción se extiende unos cinco residuos más hacia el extremo C-terminal, tanto para las secuencias de hongos como para las de mamíferos.

II.2.4. Comparación de secuencias de hongos y de mamíferos

La comparación de subunidades R de hongos y de mamíferos consistió en varios alineamientos múltiples y en un análisis que consiste en la comparación de alineamientos llamado CHAIN (*Contrast Hierarchical Alignment and Interaction Network*). Los alineamientos nos permiten saber qué regiones están conservadas y cuáles no, mientras que el CHAIN nos permite identificar residuos que se conservan específicamente en un grupo de secuencias, en este caso las de las subunidades R de hongos.

Los dominios D/D muestran cierto grado de conservación. La identidad es de alrededor del 42% entre secuencias fúngicas y de un 20% con respecto a las subunidades R de mamíferos. No son alineados automáticamente por los programas de alineamiento múltiple en el contexto de la secuencia completa. Por este motivo no se los pudo incluir en el análisis por CHAIN.

El alineamiento del dominio D/D se muestra en la figura II.4, mientras que el alineamiento del resto de la secuencia se muestra en la figura II.5. Esta figura corresponde a la salida del CHAIN. Los residuos conservados están coloreados en el alineamiento de la parte superior.

El programa CHAIN es un procedimiento estadístico que requiere la construcción de un alineamiento jerárquico. Un alineamiento jerárquico está basado en dos categorías de secuencias relacionadas: (i) un grupo principal (*foreground*) y (ii) un grupo de contraste (*background*). En este caso el grupo principal son las 40 secuencias de hongos y el grupo de contraste son las 65 secuencias de mamíferos. Los residuos identificados como diferencias conservadas en el grupo de los hongos con respecto al grupo de los mamíferos se resumen en la tabla II.1.

El patrón de conservación de los dominios D/D se evidencia cuando los dominos predichos por el SMART son alineados separadamente (figura II.4). Hay 12 residuos que se conservan en identidad o propiedades fisicoquímicas en todas las secuencias (figura II.4 A). La Val de la posición 13 del

alineamiento (figura II.4 A) está conservada en mamíferos pero no en hongos. Las posiciones 28-30 y 36-39 de la región correspondiente a la hélice II es muy conservada en hongos (figura II.4 B). Las dos Phe en la hélice II y la Leu en la hélice I esenciales para la dimerización en mamíferos (figura I.7) están también presentes en hongos (figura II.4). Los residuos esenciales para la unión con AKAPs no son conservados entre RI y RII (figura II.4), a excepción del residuo hidrofóbico de la posición 15 en el alineamiento (figura II.4 A) presente en todas las secuencias de hongos y de mamíferos.

La zona bisagra es muy variable (figura II.5). El IS sin embargo es muy conservado. La secuencia es Arg-Arg-Thr-Ser-Val-Ser-Ala/Gly-Glu-Thr/Ser, que en la secuencia de Bcy1 corresponde a la región 142-150. Al igual que las subunidades RII tienen una Ser fosforilable y por lo tanto son sustrato de PKA. La Thr(144)[1] y la Thr/Ser(150) fueron identificados como residuos que se conservan específicamente en hongos. El *linker II* es un poco más conservado que el *linker I*.

Los dominios CNB están altamente conservados, especialmente en la zona correspondiente al PBC, cuya secuencia consenso es para el dominio A Phe-Gly-Glu-Leu-Ala-Leu-Met/Ile/Leu-Tyr-Asn/Gly-X-Pro-Arg-Ala-Ala (247-260) y para el dominio B Phe-Gly-Glu-Ile/Val/Leu-Ala/Ser-Leu-Val/Ile/Leu-X-X-X-Pro-Arg-Ala/Gln/Asn/Val-Ala (366-379) (figura II.5). La identidad es del 50% entre secuencias fúngicas y de un 40% con respecto a secuencias de mamíferos. Los residuos identificados como conservados específicamente en hongos son la Phe(183), la Tyr/Phe(220), la Ala(272) en el dominio A y Val(389) y Ala (390) en el dominio B (figura II.5).

[1] De aquí en adelante, al menos que se indique lo contrario los números entre paréntesis al lado del nombre de un aminoácido corresponden a la numeración de Bcy1.

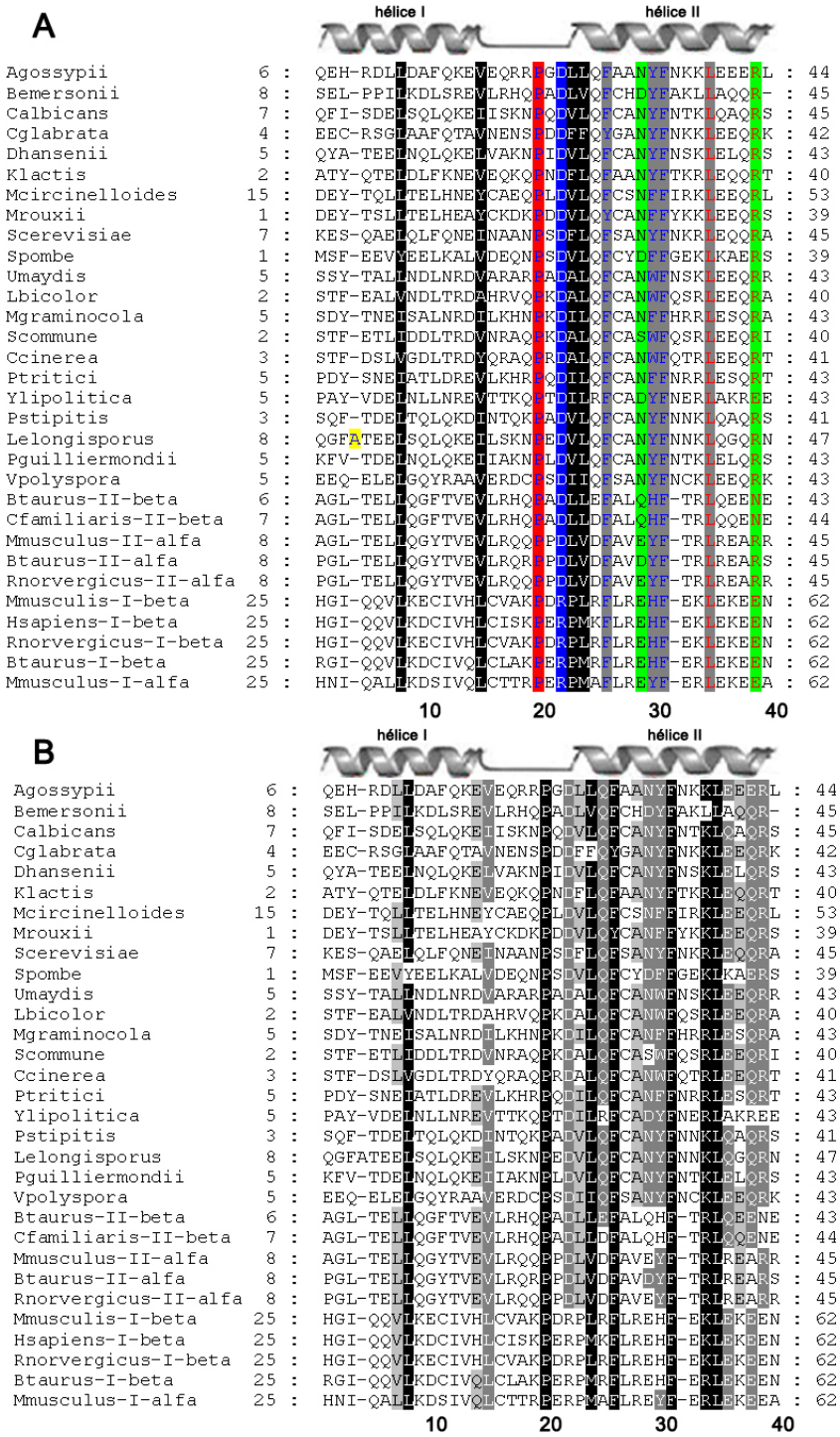
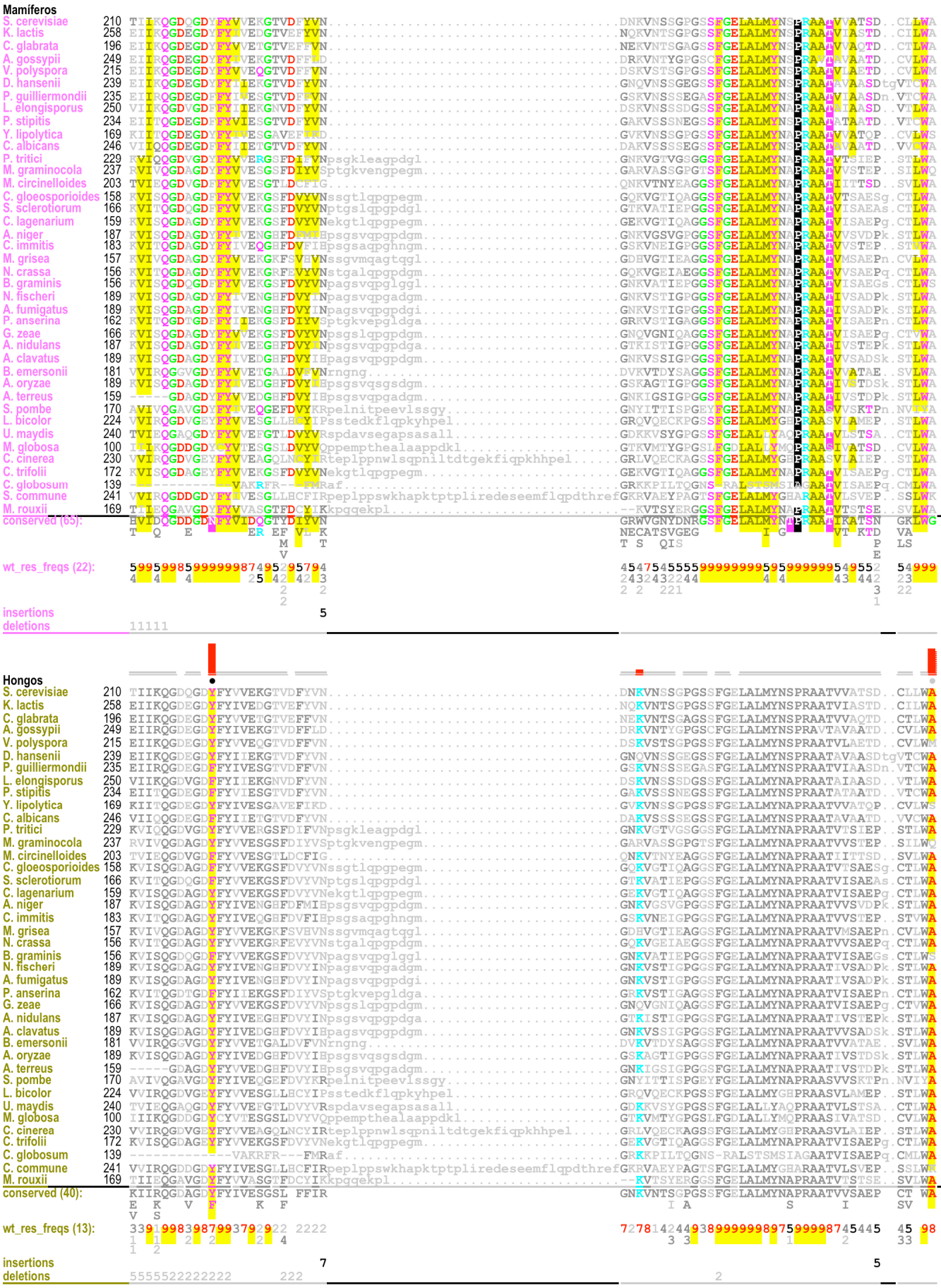
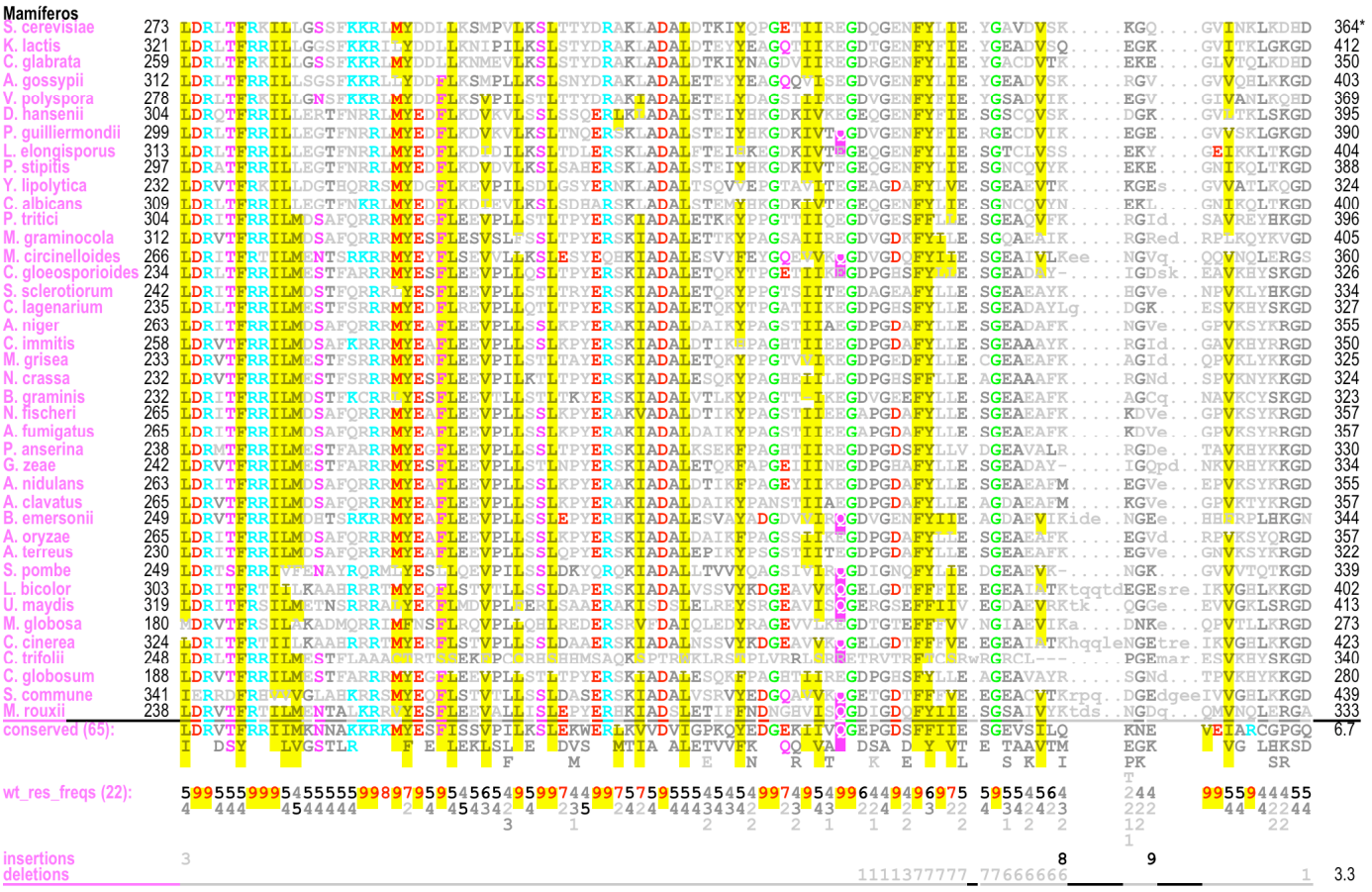
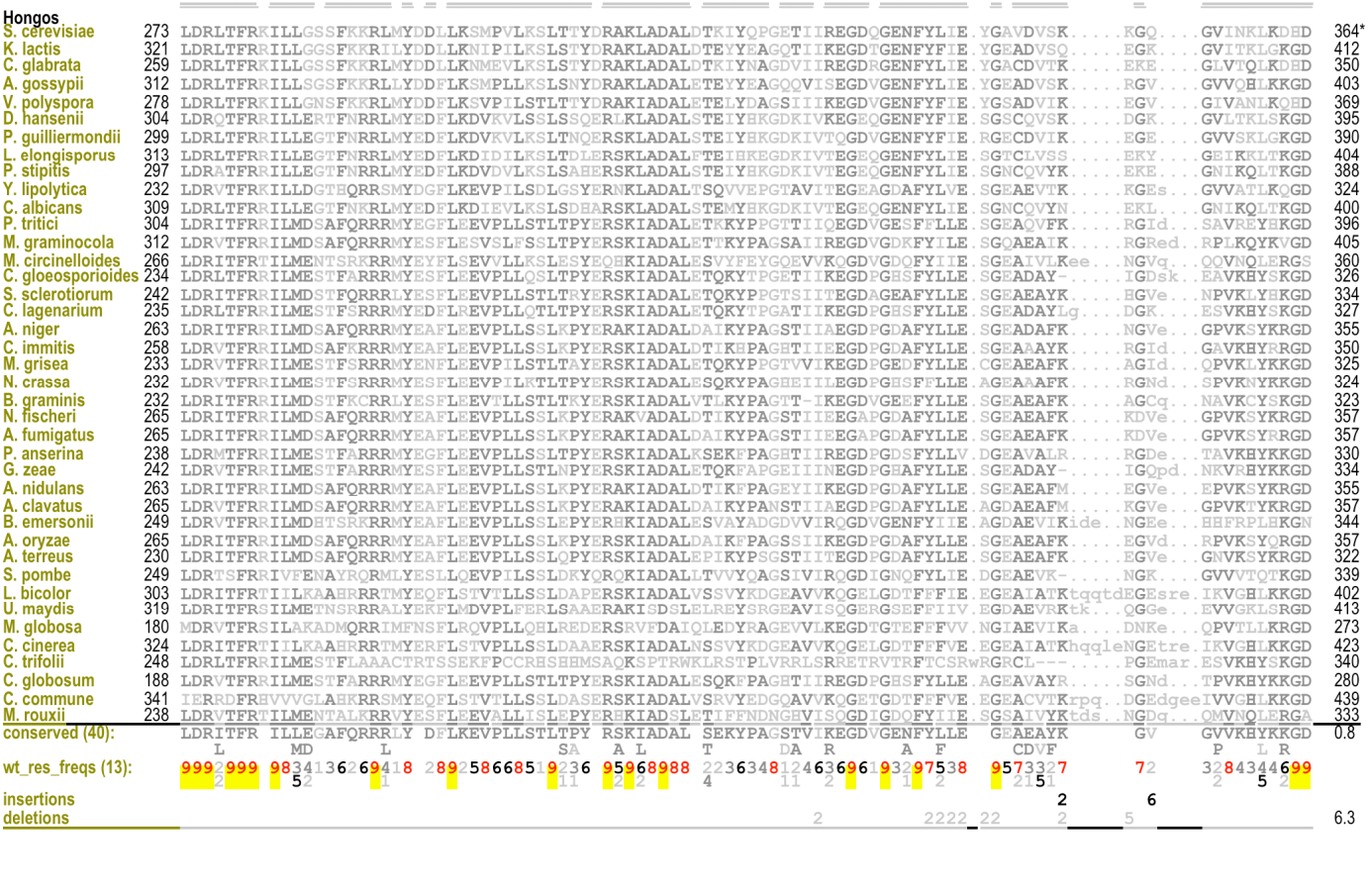


Figura II.4. Alineamiento múltiple del dominio D/D. En la parte superior del alineamiento se indica la estructura secundaria predicha para el caso de las subunidades R de hongos, la cual coincide con la estructura resuelta para las subunidades RI y RII de mamífero. Para cada secuencia a izquierda y derecha se indica la numeración de aminoácidos. En la parte inferior se indica la numeración del alineamiento. Las secuencias presentes son las 21 secuencias de hongos cuyo dominio D/D fue predicho y 10 secuencias de mamíferos, 5 RI y 5 RII, representativas del grupo. En **A** están coloreadas las posiciones con 100% de conservación de alguna característica físicoquímica. En **B** el sombreado negro, gris oscuro y gris claro corresponde a 90, 66 y 56% de conservación de tipo de aminoácido respectivamente.

Mamíferos
S. cerevisiae
K. lactis
C. glabrata
A. gossypii
V. polyspora
D. hansenii
P. guilliermondii
L. elongisporus
P. stipitis
Y. lipolytica
C. albicans
P. tritici
M. graminocola
M. circinelloides
C. gloeosporioides
S. sclerotiorum
C. lagenarium
A. niger
C. immitis
M. grisea
N. crassa
B. graminis
N. fischeri
A. fumigatus
P. anserina
G. zeae
A. nidulans
A. clavatus
B. emersonii
A. oryzae
A. terreus
S. pombe
L. bicolor
U. maydis
M. globosa
C. cinerea
C. trifolii
C. globosum
S. commune
M. rouxii
conserved (63):
wt_res_freqs (22):
insertions
deletions
Hongos
conserved (40):
wt_res_freqs (13):
insertions
deletions


Mamíferos
S. cerevisiae
K. lactis
C. glabrata
A. gossypii
V. polyspora
D. hansenii
P. guilliermondii
L. elongisporus
P. stipitis
Y. lipolytica
C. albicans
P. tritici
M. graminocola
M. circinelloides
C. gloeosporioides
S. sclerotiorum
C. lagenarium
A. niger
C. immitis
M. grisea
N. crassa
B. graminis
N. fischeri
A. fumigatus
P. anserina
G. zeae
A. nidulans
A. clavatus
B. emersonii
A. oryzae
A. terreus
S. pombe
L. bicolor
U. maydis
M. globosa
C. cinerea
C. trifolii
C. globosum
C. commune
M. rouxii
conserved (65):
wt_res_freqs (22):
insertions
deletions
Hongos
conserved (40):
wt_res_freqs (13):
insertions
deletions


Mamíferos
S. cerevisiae
K. lactis
C. glabrata
A. gossypii
V. polyspora
D. hansenii
P. guilliermondii
L. elongisporus
P. stipitis
Y. lipolytica
C. albicans
P. tritici
M. graminocola
M. circinelloides
C. gloeosporioides
S. sclerotiorum
C. lagenarium
A. niger
C. immitis
M. grisea
N. crassa
B. graminis
N. fischeri
A. fumigatus
P. anserina
G. zeae
A. nidulans
A. clavatus
B. emersonii
A. oryzae
A. terreus
S. pombe
L. bicolor
U. maydis
M. globosa
C. cinerea
C. trifolii
C. globosum
C. commune
M. rouxii
conserved (65):
wt_res_freqs (22):
insertions
deletions


Hongos
S. cerevisiae
K. lactis
C. glabrata
A. gossypii
V. polyspora
D. hansenii
P. guilliermondii
L. elongisporus
P. stipitis
Y. lipolytica
C. albicans
P. tritici
M. graminocola
M. circinelloides
C. gloeosporioides
S. sclerotiorum
C. lagenarium
A. niger
C. immitis
M. grisea
N. crassa
B. graminis
N. fischeri
A. fumigatus
P. anserina
G. zeae
A. nidulans
A. clavatus
B. emersonii
A. oryzae
A. terreus
S. pombe
L. bicolor
U. maydis
M. globosa
C. cinerea
C. trifolii
C. globosum
C. commune
M. rouxii
conserved (40):
wt_res_freqs (13):
insertions
deletions

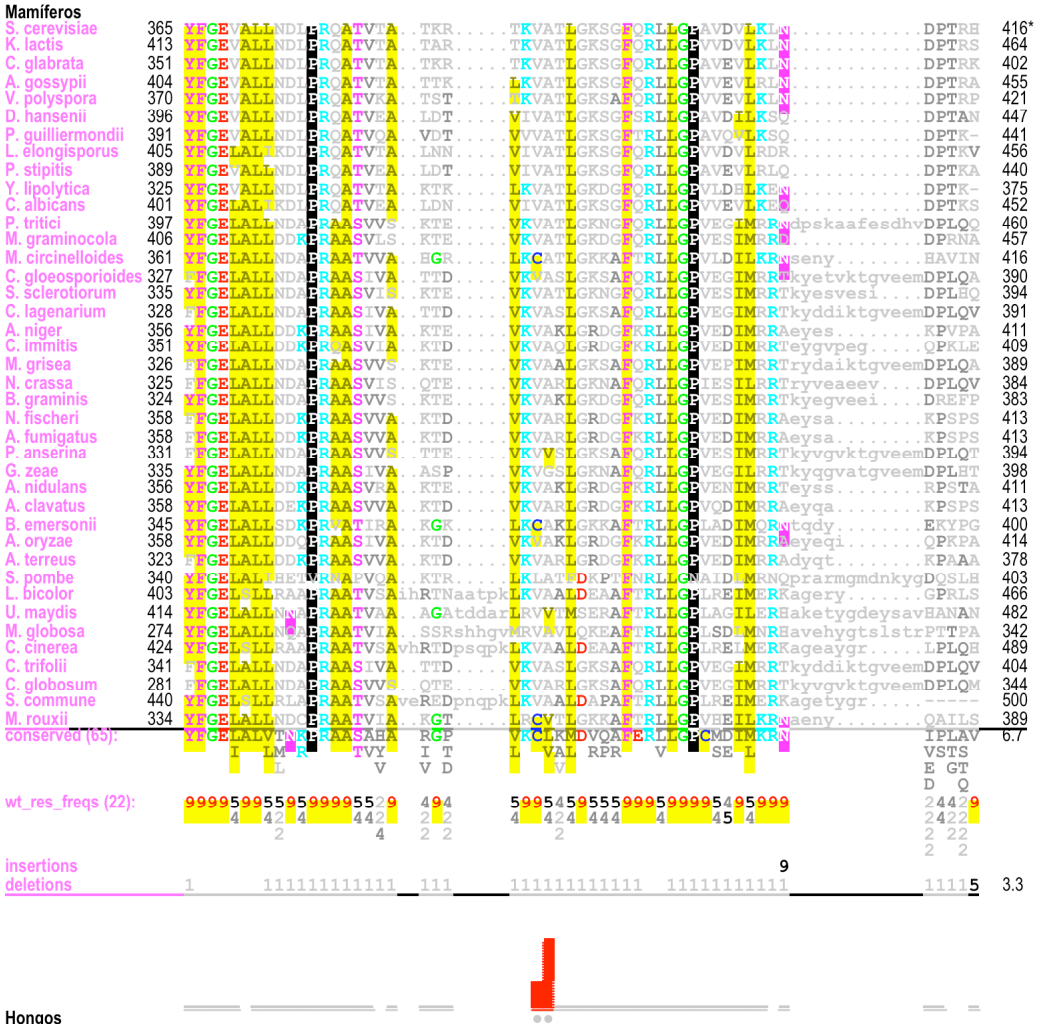

Mamíferos
S. cerevisiae 365 YFGEVALLNDLPRQATVTA..TKR.....TKVATLGKSGFQRLLGPAVDVLKLN.....DPTRH 416*
K. lactis 413 YFGEVALLNDLPRQATVTA..TAR.....TKVATLGKSGFQRLLGPVVDVLKLN.....DPTRS 464
C. glabrata 351 YFGEVALLNDLPRQATVTA..TKR.....TKVATLGKSGFQRLLGPAVEVLKLN.....DPTRK 402
A. gossypii 404 YFGEVALLNDLPRQATVTA..TTK.....LKVATLGKSGFQRLLGPVVEVLRLN.....DPTRA 455
V. polyspora 370 YFGEVALLNDLPRQATVKA..TST.....TKVATLGKSAFQRLLGPVVEVLKLN.....DPTRP 421
D. hansenii 396 YFGEVALLNDLPRQATVEA..LDT.....VIVATLGKSGFSRLLGPAVDILKSQ.....DPTAN 447
P. guilliermondii 391 YFGEVALLNDLPRQATVQA..VDT.....VVVATLGKSGFTRLLGPAVQVLKSQ.....DPTK- 441
L. elongisporus 405 YFGELALIKDLPRQATVTA..LNN.....VIVATLGKSGFQRLLGPVVDVLRDR.....DPTKV 456
P. stipitis 389 YFGEVALLNDLPRQATVEA..LDT.....VIVATLGKSGFQRLLGPAVEVLRLQ.....DPTKA 440
Y. lipolytica 325 YFGEVALLNDLPRQATVTA..KTK.....LKVATLGKDGFQRLLGPVLDELKEN.....DPTK- 375
C. albicans 401 YFGELALIKDLPRQATVEA..LDN.....VIVATLGKSGFQRLLGPVVEVLKEQ.....DPTKS 452
P. tritici 397 YFGELALLNDAPRAASVVS..KTE.....VKVATLGKNGFQRLLGPVEGIMRRwdpskaafesdhvDPLQQ 460
M. graminocola 406 YFGELALLDDKPRAASVLS..KTE.....VKVATLGKDGFQRLLGPVESIMRRR.....DPRNA 457
M. circinelloides 361 YFGELALLNDAPRAATVVA..HGR.....LKCATLGKKAFTRLLGPVLDILKRNseny.....HAVIN 416
C. gloeosporioides 327 FFGELALLNDAPRAASIVA..TTD.....VKVASLGKSAFQRLLGPVEGIMRRRkyetvktgveemDPLQA 390
S. sclerotiorum 335 YFGELALLNDAPRAASVIS..KTE.....VKVATLGKNGFQRLLGPVESIMRRTkyesvesi....DPLHQ 394
C. lagenarium 328 FFGELALLNDAPRAASIVA..TTD.....VKVASLGKSAFQRLLGPVEGIMRRTkyddiktgveemDPLQV 391
A. niger 356 YFGELALLDDKPRAASIVA..KTE.....VKVAKLGRDGFKRLLGPVEDIMRRAeyes.....KPVPA 411
C. immitis 351 YFGELALLDDKPRQASVIA..KTD.....VKVAQLGRDGFKRLLGPVEDIMRRTeygvpeg.....QPKLE 409
M. grisea 326 FFGELALLNDAPRAASVVS..KTE.....VKVAALGKSAFQRLLGPVEPIMRRTrydaiktgveemDPLQA 389
N. crassa 325 FFGELALLNDAPRAASVIS..QTE.....VKVARLGKNAFQRLLGPIESILRRTryveaeev....DPLQV 384
B. graminis 324 YFGELALLNDAPRAASVVS..KTE.....VKVAKLGKDGFQRLLGPVESIMRRTkyegveei....DREFP 383
N. fischeri 358 FFGELALLDDKPRAASVVA..KTD.....VKVARLGRDGFKRLLGPVEDIMRRAeysa.....KPSPS 413
A. fumigatus 358 FFGELALLDDKPRAASVVA..KTD.....VKVARLGRDGFKRLLGPVEDIMRRAeysa.....KPSPS 413
P. anserina 331 FFGELALLNDAPRAASVVS..TTE.....VKVVSLGKSAFQRLLGPVESIMRRTkyvgvktgveemDPLQT 394
G. zeae 335 YFGELALLNDAPRAASIVA..ASP.....VKVGSLGKNAFQRLLGPVEGILRRTkyqgvatgveemDPLHT 398
A. nidulans 356 YFGELALLDDKPRAASVRA..KTE.....VKVAKLGRDGFKRLLGPVENIMRRTeyss.....RPSTA 411
A. clavatus 358 YFGELALLDEKPRAASVVA..KTD.....VKVARLGRDGFKRLLGPVQDIMRRAeyqa.....KPSPS 413
B. emersonii 345 YFGELALLSDKPRVATIRA..KGK.....LKCAKLGKKAFTRLLGPLADIMQRwtqdy.....EKYPG 400
A. oryzae 358 YFGELALLDDQPRAASIVA..KTD.....VKVAKLGRDGFKRLLGPVEDIMRRAeyeqi.....QPKPA 414
A. terreus 323 FFGELALLDDKPRAASVVA..KTD.....VKVARLGRDGFKRLLGPVEDIMRRAdyqt.....KPAAA 378
S. pombe 340 YFGELALIHETVRNAPVQA..KTR.....LKLATFDKPTFNRLLGNAIDLMRNQprarmgmdnkygDQSLH 403
L. bicolor 403 YFGELSLLRAAPRAATVSAihRTNaatpkLKVAALDEAAFTRLLGPLREIMERKagery.....GPRLS 466
U. maydis 414 YFGELALLNNAPRAATVAA..AGAtddarLRVVTMSERAFTRLLGPLAGILERHaketygdeysavHANAN 482
M. globosa 274 YFGELALLNQAPRAATVIA..SSRshhgvMRVAVLQKEAFTRLLGPLSDLMNRHavehygtslstrPTTPA 342
C. cinerea 424 YFGELSLLRAAPRAATVSAvhRTDpsqpkLKVAALDEAAFTRLLGPLRELMERKageaygr.....LPLQH 489
C. trifolii 341 FFGELALLNDAPRAASIVA..TTD.....VKVASLGKSAFQRLLGPVEGIMRRTkyddiktgveemDPLQV 404
C. globosum 281 FFGELALLNDAPRAASVVS..QTE.....VKVARLGKSAFQRLLGPVEGIMRRTkyvgvktgveemDPLQM 344
S. commune 440 YFGELSLLRLAPRAATVSAveREDpnqpkLKVAALDAPAFTRLLGPLREIMERKagetygr.....----- 500
M. rouxii 334 YFGELALLNDCPRAATVIA..KGT.....LRCVTLGKKAFTRLLGPVHEILKRwaeny.....QAILS 389
conserved (63): YFGELALVTNKPRAASAHA RGP VKCLKMDVQAFERLLGPCMDIMKRN IPLAV 6.7
I LM R TVY I T L VAL RPR V SE L VSTS
L V V E GT
D Q
wt_res_freqs (22): 9999599559599995529 494 5995459555999599999549599 9 2442 9
4 42 4 442 2 2 4 4 424 444 4 45 4 2422
2 4 2 2 2 2 2 2
insertions 9
deletions 1 111111111111 111 111111111111 11111111111 11115 3.3
Hongos
S. cerevisiae 365 YFGEVALLNDLPRQATVTA..TKR.....TKVATLGKSGFQRLLGPAVDVLKLN.....DPTRH 416*
K. lactis 413 YFGEVALLNDLPRQATVTA..TAR.....TKVATLGKSGFQRLLGPVVDVLKLN.....DPTRS 464
C. glabrata 351 YFGEVALLNDLPRQATVTA..TKR.....TKVATLGKSGFQRLLGPAVEVLKLN.....DPTRK 402
A. gossypii 404 YFGEVALLNDLPRQATVTA..TTK.....LKVATLGKSGFQRLLGPVVEVLRLN.....DPTRA 455
V. polyspora 370 YFGEVALLNDLPRQATVKA..TST.....TKVATLGKSAFQRLLGPVVEVLKLN.....DPTRP 421
D. hansenii 396 YFGEVALLNDLPRQATVEA..LDT.....VIVATLGKSGFSRLLGPAVDILKSQ.....DPTAN 447
P. guilliermondii 391 YFGEVALLNDLPRQATVQA..VDT.....VVVATLGKSGFTRLLGPAVQVLKSQ.....DPTK- 441
L. elongisporus 405 YFGELALIKDLPRQATVTA..LNN.....VIVATLGKSGFQRLLGPVVDVLRDR.....DPTKV 456
P. stipitis 389 YFGEVALLNDLPRQATVEA..LDT.....VIVATLGKSGFQRLLGPAVEVLRLQ.....DPTKA 440
Y. lipolytica 325 YFGEVALLNDLPRQATVTA..KTK.....LKVATLGKDGFQRLLGPVLDELKEN.....DPTK- 375
C. albicans 401 YFGELALIKDLPRQATVEA..LDN.....VIVATLGKSGFQRLLGPVVEVLKEQ.....DPTKS 452
P. tritici 397 YFGELALLNDAPRAASVVS..KTE.....VKVATLGKNGFQRLLGPVEGIMRRNdpskaafesdhvDPLQQ 460
M. graminocola 406 YFGELALLDDKPRAASVLS..KTE.....VKVATLGKDGFQRLLGPVESIMRRD.....DPRNA 457
M. circinelloides 361 YFGELALLNDAPRAATVVA..HGR.....LKCATLGKKAFTRLLGPVLDILKRNseny.....HAVIN 416
C. gloeosporioides 327 FFGELALLNDAPRAASIVA..TTD.....VKVASLGKSAFQRLLGPVEGIMRRTkyetvktgveemDPLQA 390
S. sclerotiorum 335 YFGELALLNDAPRAASVIS..KTE.....VKVATLGKNGFQRLLGPVESIMRRTkyesvesi....DPLHQ 394
C. lagenarium 328 FFGELALLNDAPRAASIVA..TTD.....VKVASLGKSAFQRLLGPVEGIMRRTkyddiktgveemDPLQV 391
A. niger 356 YFGELALLDDKPRAASIVA..KTE.....VKVAKLGRDGFKRLLGPVEDIMRRAeyes.....KPVPA 411
C. immitis 351 YFGELALLDDKPRQASVIA..KTD.....VKVAQLGRDGFKRLLGPVEDIMRRTeygvpeg.....QPKLE 409
M. grisea 326 FFGELALLNDAPRAASVVS..KTE.....VKVAALGKSAFQRLLGPVEPIMRRTrydaiktgveemDPLQA 389
N. crassa 325 FFGELALLNDAPRAASVIS..QTE.....VKVARLGKNAFQRLLGPIESILRRTryveaeev....DPLQV 384
B. graminis 324 YFGELALLNDAPRAASVVS..KTE.....VKVAKLGKDGFQRLLGPVESIMRRTkyegveei....DREFP 383
N. fischeri 358 FFGELALLDDKPRAASVVA..KTD.....VKVARLGRDGFKRLLGPVEDIMRRAeysa.....KPSPS 413
A. fumigatus 358 FFGELALLDDKPRAASVVA..KTD.....VKVARLGRDGFKRLLGPVEDIMRRAeysa.....KPSPS 413
P. anserina 331 FFGELALLNDAPRAASVVS..TTE.....VKVVSLGKSAFQRLLGPVESIMRRTkyvgvktgveemDPLQT 394
G. zeae 335 YFGELALLNDAPRAASIVA..ASP.....VKVGSLGKNAFQRLLGPVEGILRRTkyqgvatgveemDPLHT 398
A. nidulans 356 YFGELALLDDKPRAASVRA..KTE.....VKVAKLGRDGFKRLLGPVENIMRRTeyss.....RPSTA 411
A. clavatus 358 YFGELALLDEKPRAASVVA..KTD.....VKVARLGRDGFKRLLGPVQDIMRRAeyqa.....KPSPS 413
B. emersonii 345 YFGELALLSDKPRVATIRA..KGK.....LKCAKLGKKAFTRLLGPLADIMQRNtqdy.....EKYPG 400
A. oryzae 358 YFGELALLDDQPRAASIVA..KTD.....VKVAKLGRDGFKRLLGPVEDIMRRAeyeqi.....QPKPA 414
A. terreus 323 FFGELALLDDKPRAASVVA..KTD.....VKVARLGRDGFKRLLGPVEDIMRRAdyqt.....KPAAA 378
S. pombe 340 YFGELALIHETVRNAPVQA..KTR.....LKLATFDKPTFNRLLGNAIDLMRNQprarmgmdnkygDQSLH 403
L. bicolor 403 YFGELSLLRAAPRAATVSAihRTNaatpkLKVAALDEAAFTRLLGPLREIMERKagery.....GPRLS 466
U. maydis 414 YFGELALLNNAPRAATVAA..AGAtddarLRVVTMSERAFTRLLGPLAGILERHaketygdeysavHANAN 482
M. globosa 274 YFGELALLNQAPRAATVIA..SSRshhgvMRVAVLQKEAFTRLLGPLSDLMNRHavehygtslstrPTTPA 342
C. cinerea 424 YFGELSLLRAAPRAATVSAvhRTDpsqpkLKVAALDEAAFTRLLGPLRELMERKageaygr.....LPLQH 489
C. trifolii 341 FFGELALLNDAPRAASIVA..TTD.....VKVASLGKSAFQRLLGPVEGIMRRTkyddiktgveemDPLQV 404
C. globosum 281 FFGELALLNDAPRAASVVS..QTE.....VKVARLGKSAFQRLLGPVEGIMRRTkyvgvktgveemDPLQM 344
C. commune 440 YFGELSLLRLAPRAATVSAveREDpnqpkLKVAALDAPAFTRLLGPLREIMERKagetygr.....----- 500
M. rouxii 334 YFGELALLNDCPRAATVIA..KGT.....LRCVTLGKKAFTRLLGPVHEILKRNaeny.....QAILS 389
conserved (40): FFGELALLNDAPRQATV A KTE V VATLGKSGFQRLLGPVEGVMR T DP A 0.8
Y V L S T R L D T LV L
wt_res_freqs (13): 2999889867499295 8 8 352 5 884977349499999632165 2 57 2
7 1 2 4 2 1 3 1 3 22 3
insertions 7 1 7 2
deletions 221 6.3

Tabla II.1. Residuos identificados por CHAIN.

	Hongos	Mamíferos
Linker	Thr144	Gly/Ala
	Ser/Thr/150	Val/Ala/Thr
CNB-A	Phe183	Leu/Val
	Tyr/Phe220	Asn
	Ala272	Gly
CNB-B	Val389	Cys
	Ala390	Leu/Val

La numeración es la de la secuencia de Bcy1.

II.2.5. Modelado del dominio de D/D

Se modelaron por homología los dominios D/D predichos de *S.cerevisiae* y de *M.rouxii*, a través del servidor de Swiss-Model. Se utilizó como molde la estructura del dominio D/D de RIIα de rata unida al dominio AKB de la AKAP D-AKAP2 (PDB ID: 2HWN). Elegimos este modelo pues se realizaron algunos experimentos con el dominio AKB de esta AKAP como se muestra en el capítulo III. Si bien el dominio D/D de Bcy1 comparte con la subunidad RII la ausencia de puentes disulfuros, no se parece más a una isoforma que a otra.

Al igual que para la subunidad RIIα la estructura está formada por dos cadenas dispuestas en forma de X. Cada cadena contiene α-hélices separadas por un *loop* que incluye una Pro.

El interior de la estructura es hidrofóbico, mientras que la superficie está formada por residuos polares y cargados, tanto en la estructura cristalina de mamífero como en las estructuras modeladas (figura II.6).

La superficie de contacto de la subunidad RIIα con el dominio AKB es hidrofóbica. Esta misma región tanto en el modelo de *S.cerevisiae* como en el de *M.rouxii* es más polar, aunque se puede observar una grieta hidrofóbica en una dirección aproximada de -50°.

Figura II.5. Alineamiento jerárquico de la región del IS, el *linker II* y dominios CNB de las subunidades R de hongos y de mamíferos. Se muestra el alineamiento de las secuencias de hongos dos veces: en la parte superior y en la parte inferior. En el alineamiento de la parte superior están coloreados los residuos conservados. El histograma en la parte superior del segundo alineamiento indica la fuerza de las restricciones en el grupo de hongos en cada posición. Los puntos por debajo del histograma indican los residuos identificados por el CHAIN como característicos del grupo, los cuales se encuentran coloreados. Las secuencias de mamíferos se muestran indirectamente a través de los patrones consenso y las frecuencias relativas de los residuos (wt_res_freqs). Se muestra también el patrón consenso y las frecuencias correspondientes a las secuencias de hongos.

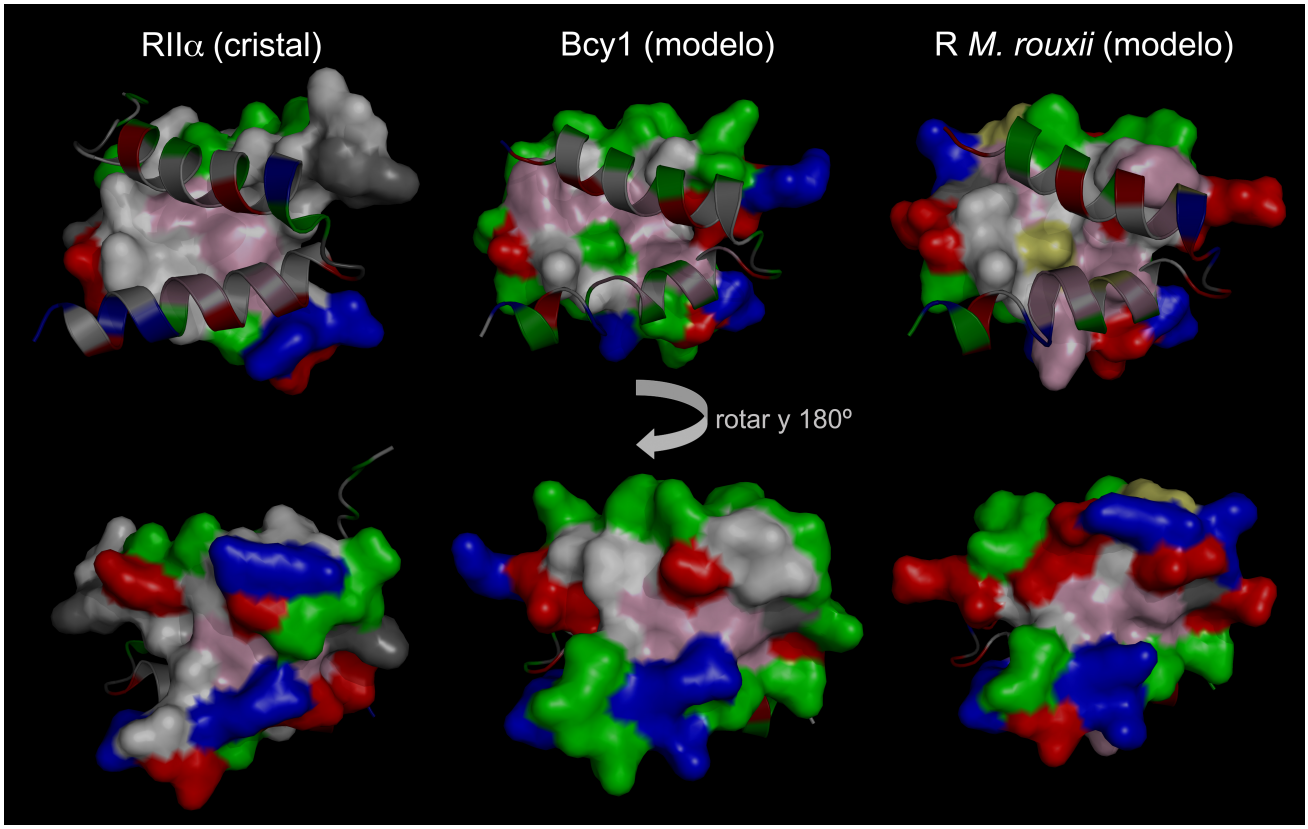


Figura II.6. Estructuras del dominio D/D de la subunidad RIIα de rata unida al dominio AKB de la AKAP D-AKAP2 (PDB ID: 2HWN), y de los modelos de las subunidades R de *S.cerevisiae* y *M.rouxii*. Las estructuras están coloreadas de acuerdo a la naturaleza química de los aminoácidos: verde, polares; rojo, cargados negativamente; azul, cargados positivamente; blanco, hidrofóbicos alifáticos; rosa, aromáticos; gris, Pro y amarillo, Cys. Se representa una de las cadenas como *cartoon* y la otra como *superficie*. En la parte superior se muestra el interior de la estructura, mientras que en la parte inferior se muestra la superficie externa.

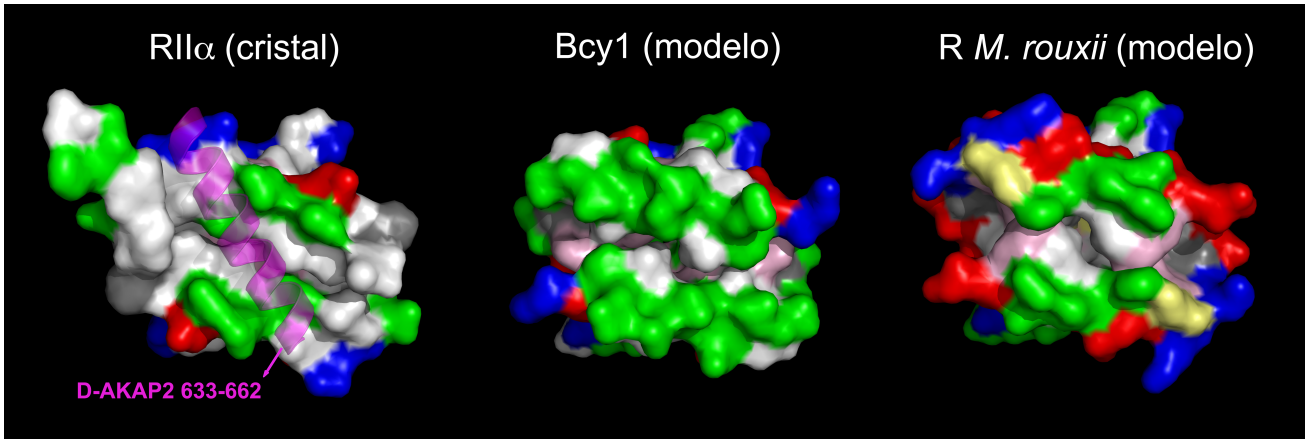


Figura II.7. Las mismas estructuras de la figura II.6, coloreadas de la misma manera. Las estructuras están giradas 90º hacia adente (eje *z*) con repecto a la figura anterior, es decir se muestra la superficie que está en la parte superior de las estructuras de la figura anterior. El domino D/D se representa como *superficie*. En fuscia se muestra el dominio AKB de la AKAP D-AKAP2, representado como *cartoon*. Se muestra la superficie de contacto del dominio D/D con la α-hélice del dominio AKB para la subunidad RIIα y la zona equivalente en las estructuras modeladas.

II.3 Conclusiones y discusión

Del análisis bioiformático de las secuencias concluímos que sólo algunas secuencias tienen el dominio D/D (figura II.2). Para aquellas subunidades que tienen el dominio D/D, este se encuentra en el extremo N-terminal. Todas las secuencias que carecen de este dominio pertenecen a un mismo grupo: *Subfilum* Pezizomycotina del *Filum* Ascomycota. Si bien podemos estar bastante seguros de la ausencia del dominio D/D en este grupo debido al gran número de secuencias colectadas del grupo (19 de las 40 secuencias), no podemos asegurar que la presencia del dominio D/D en los otros grupos sea una regla. Esto se debe a que los distintos grupos de hongos no están igualmente representados en la comparación (figura II.1).

La ausencia del dominio D/D similar al de mamíferos en algunos hongos puede implicar que las subunidades R no dimerizan o que lo hacen a través de otros motivos. Lo mismo ocurre con la localización: no se anclan a proteínas de anclaje o lo hacen a través de otros motivos.

Si bien la secuencia de los dominios D/D de hongos no es muy conservada, se conservan residuos claves para la dimerización (figura II.4). Los dominios D/D podrían formar una estructura similar a la de mamíferos: dos cadenas dispuestas en forma de X, cada una de las cuales contiene dos α-hélices. Al igual que en el caso de mamíferos el interior de esta estructura sería hidrofóbico, mientras que la supeficie exterior, rica en residuos polares y cargados (figura II.6). La zona de contacto con el dominio AKB de las AKAPs parece ser diferente, ya que en las estructuras modeladas de *S.cerevisiae* y *M.rouxii* se forma una grieta hidrofóbica orientada de manera diferente que podría hacer contacto con la α-hélice anfipática del dominio AKB (figura II.7).

La zona bisagra es muy variable. Contiene al IS, un motivo bastante conservado. Algunos de los residuos conservados del IS son específicos de hongos: Thr(144) y Thr/Ser(150). El *linker II* es un poco más conservado que el *linker I* (figuras II.3 y II.5).

Se han identificado zonas de baja complejidad en la zona bisagra, en especial en el *linker I* (figura II.3), que podrían participar en la interacción con otras proteínas, en particular con la subunidad C. Como ya se describió en el capítulo I la estructura cristalina del complejo R-C de mamíferos reveló que el *linker II* de la subunidad R es una zona de interacción con la subunidad C. Todavía no existen evidencias certeras que indiquen que el *linker I* forma parte de la interacción.

Por último, se observó que todas las subunidades R de hongos tienen los dominios CNB en el extremo C-terminal (figura II.2). Estos se encuentran muy conservados, especialmente el PBC. Los residuos identificados como conservados específicamente en hongos son la Phe(183), la Tyr/Phe(220), la Ala(272) en el dominio A y Val(389) y Ala (390) en el dominio B (figura II.5). El hecho de que la secuencia de los dominios CNB sea en ciertas regiones tan conservada hace

pensar en una arquitectura general de estos dominios en hongos similar a la de los dominios de mamíferos, aunque la presencia de residuos muy conservados específicamente en hongos podría estar hablando de algunas diferencias estructurales y/ tal vez funcionales importantes.

CAPITULO III:
DOMINIO DE DIMERIZACION Y ANCLAJE

III.1. Introducción y objetivos específicos

Como ya se describió en los capítulos anteriores las subunidades R de mamíferos tienen en su extremo N-terminal un dominio de dimerización y anclaje, a través del cual las subunidades R se unen entre sí y a otras proteínas llamadas AKAPs.

De acuerdo al análisis bioinformático este dominio estaría presente sólo en algunas subunidades R de hongos. Nos preguntamos si el motivo D/D es funcional, es decir si aquellas subunidades R que presentan el motivo son capaces de dimerizar. Conocemos dos ejemplos que confirman esta hipótesis. Son justamente los modelos con los cuales trabaja nuestro laboratorio, *M.rouxii* (Paveto, C. et al., 1989; Pastori, R. et al., 1985) y *S.cerevisiae* (Johnson, K.E. et al., 1987; Uno, I. et al., 1982), cuyas subunidades R dimerizan.

Las subunidades R de los hongos pertenecientes a la *Subfilum* Pezizomycotina del *Filum* Ascomycota, las cuales carecen del motivo, podrían no dimerizar o hacerlo a través de otro motivo. La otra pregunta que surgió es si las subunidades de este grupo dimerizan o no.

Para contestar esta pregunta estimamos el coeficiente de sedimentación de la PKA de *Saccharomyces cerevisiae* como representante del grupo que presenta dominio D/D y de *Neurospora crassa* como representante del grupo que carece de dominio D/D. A través del coeficiente de sedimentación y de la comparación con los coeficientes de sedimentación de PKA de otros organismos pudimos sacar conclusiones acerca de la estructura cuaternaria de *N.crassa*.

La localización de Bcy1 en *S.cerevisiae* es dinámica, variando en respuesta a los cambios del ambiente (Griffioen, G. et al., 2001, Recouvreux, V. et al., en preparación). En levaduras el extremo N-terminal de Bcy1 es el responsable de la localización subcelular (Griffioen, G. et al., 2000). Nos preguntamos si era responsable también de la dimerización.

Abordamos esta pregunta de un modo similar al de la pregunta anterior: estimamos el coeficiente de sedimentación en un gradiente de sacarosa de Bcy1 y de la mutante de deleción que carece del extremo N-terminal.

Hasta el momento no se han identificado proteínas AKAPs en levaduras, utilizando aproximaciones bioqímicas. Debido a que las AKAPs de mamíferos no son muy conservadas, las búsquedas *in silico* no fueron exitosas. A través de un experimento de doble híbrido, usando el extremo N-terminal de Bcy1 como cebo se identificó la proteína Zds1 (Griffioen, G. et al., 2001). Zds1 afecta la localización subcelular de Bcy1, de acuerdo a experimentos de deleción y de sobreexpresión de Zds1 (Griffioen, G. et al., 2001). No está claro aún si Zds1 puede ser considerada una proteína AKAPs. No se han descripto otros interactores del extremo N-terminal de Bcy1.

Finalmente nos preguntamos si el extremo N-terminal de Bcy1 es capaz de unirse al dominio AKB de una AKAP de mamífero a falta de proteína de anclaje en levaduras. Esta pregunta fue contestada a través de la técnica de *pull-down*. Se utilizó el AKB de la AKAP D-AKAP2.

III.2. Resultados y discusión

III.2.1. Estructura cuaternaria de la PKA de *Neurospora crassa*

De acuerdo al análisis bioinformático algunas subunidades de hongos presentan dominio D/D y otras no lo hacen. Una de las preguntas que surgió de esta observación es si las subunidades R a las cuales no se les predice dominio D/D dimerizan a través de otros motivos o si son monoméricas.

Para contestar esta pregunta se tomó como ejemplo del grupo de hongos que carece de dominio D/D a *Neurospora crassa* y como ejemplo del grupo que presenta dominio D/D a *Saccharomyces cerevisiae*. Se estimó el coeficiente de sedimentación en un gradiente de sacarosa de las holoenzimas de los hongos mencionados.

Neurospora crassa es un hongo filamentoso. Se identificaron dos genes que codifican para la subunidad C -uno de los cuales sería el responsable de toda la actividad detectable (Huang, G. et al., 2007) - y uno que codifica para la subunidad R.

Las holoenzimas parcialmente purificadas fueron sometidas a un gradiente de sacarosa 5-20% (p/v) con (gradiente disociante) y sin (gradiente no disociante) el agregado de cAMP y NaCl. El cAMP junto con el NaCl desarman la interacción R-C. Con el fin de calibrar el gradiente para estimar los coeficientes de sedimentación, se incluyeron las siguientes proteínas estándar: catalasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y citocromo C, cuyos coeficientes de sedimentación son conocidos. Se midió actividad fosfotransferasa en cada fracción, en ausencia y en presencia de cAMP. Se compararon las movilidades en el gradiente de las holoenzimas (paneles A y B de la figura III.1) y de las subunidades catalíticas (paneles C y D de la figura III.1) de ambos organismos. Se estimaron los coeficientes de sedimentación (figura III.2 y tabla III.1).

Las subunidades C de ambos organismos tienen una movilidad similar, mientras que las holoenzimas tienen movilidades bien diferentes. De acuerdo a los coeficientes de sedimentación, la holoenzima de *S.cerevisiae* es mucho más grande que la de *N.crassa*.

El coeficiente de las subunidades C de otros orgamismos es de alrededor de 3 (tabla III.2), al igual que el obtenido para *S.cerevisiae* y *N.crassa* (taba III.1). El coeficiente de sedimentación de la holoenzima de de *S.cerevisiae* fue 7,2, (tabla III.1), similar al valor ya obtenido (tabla III.2) y similar también al de otras holoenzimas tetramérícas como la de *M.rouxii* y la de mamíferos (tabla III.2). Por otro lado la holoenzima dimérica de la ameba *Dictyostelium discoideum*, formada por una subunidad C y una R y los dímeros R-C generados por la digestión con tripsina de *M.rouxii* y de

mamífero (R') tienen un coeficiente de sedimentación (tabla III.2) similar al de la holoenzima de *N.crassa* (tabla III.1).

De la estimación de los coeficientes de sedimentación y de la comparación con las PKAs de otros sistemas, verificamos que la holoenzima de *S.cerevisiae* es un tetrámero, formado por dos subunidades C y dos subunidades R y concluímos que la holoenzima de *N.crassa* es un dímero formado por una subunidad R y una C.

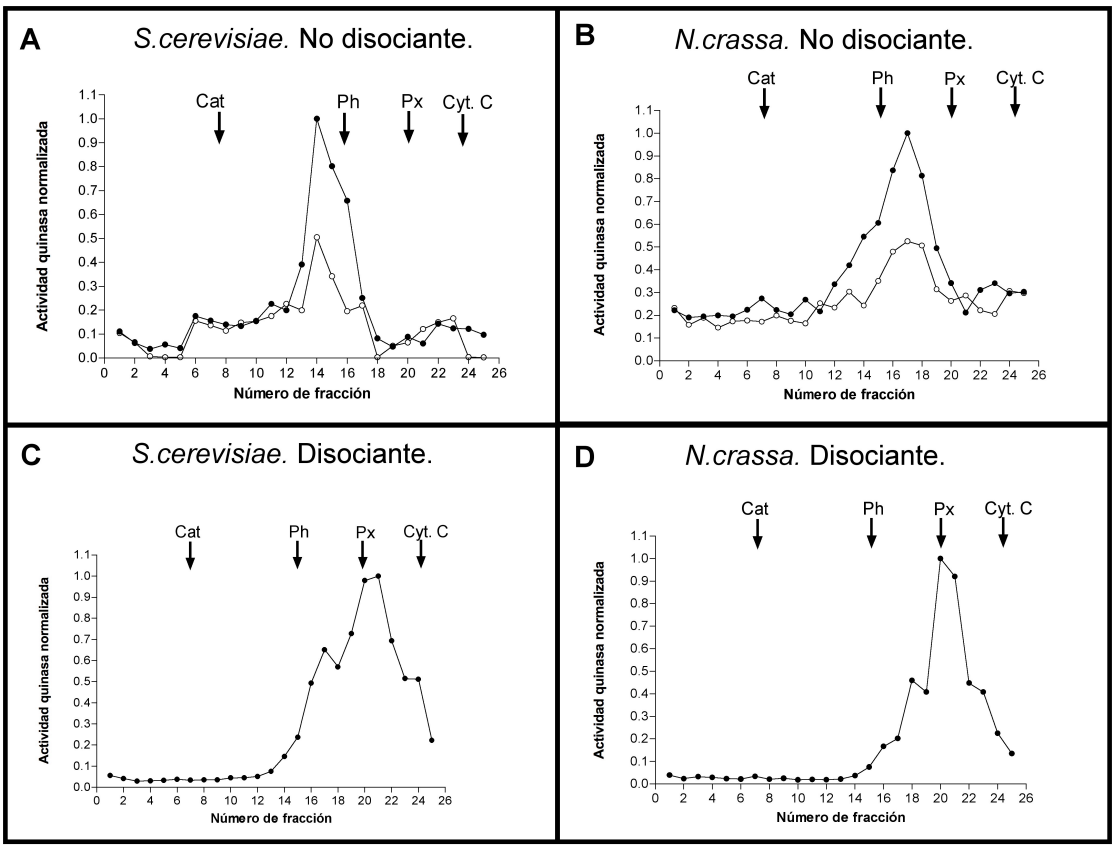


Figura III.1. Gradiente de sacarosa no disociantes (paneles A y B) y disociantes (paneles C y D) de la PKA parcialmente purificada de *S.cerevisiae* (paneles A y C) y de *N.crassa* (paneles B y D). Se ensayó la actividad fosfotransferasa de la PKA en cada fracción del gradiente. En los gradientes no disociantes la actividad se ensayó en ausencia (○) y en presencia (●) de 10 μM de cAMP. El eje *y* representa la actividad fosfotransferasa normalizada al valor máximo de cada panel; el eje *x*, el número de fracciones. Para la estimación de los coeficientes de sedimentación los gradientes fueron calibrados con las siguientes proteínas estándar: catalasa (Cat), fosfatasa alcalina (Ph), peroxidasa (Px), citrocromo C (Cyt. C). Los gráficos muestran experimentos representativos.

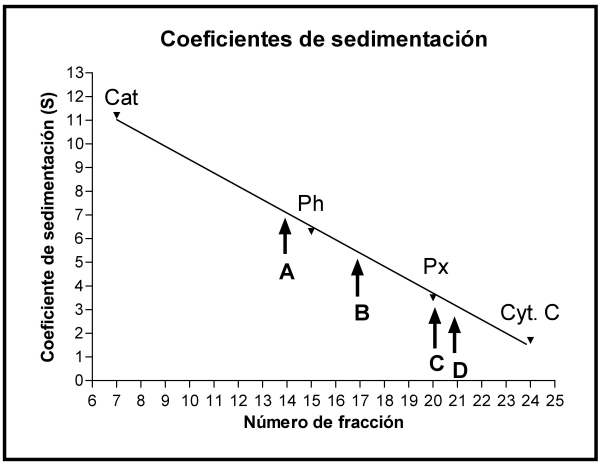


Figura III.2. Curva de calibración de coeficiente de sedimentación. El gráfico representa el coeficiente de sedimentación ya conocido de los marcadores en función del número de fracción del gradiente. Se ajustó la curva a una recta. Las letras A-D corresponden a los picos máximos de los paneles de la figura anterior. El gráfico corresponde a los experimentos mostrados en la figura anterior.

Tabla III.1. Coeficientes de sedimentación.

Panel	Gradiente	S
A	S.cerevisiae. No disociante	7,2 ± 0,3
B	N.crassa. No disociante	5,2 ± 0,2
C	S.cerevisiae. Disociante	3,4 ± 0,2
D	N.crassa. Disociante	3,5 ± 0,2

Los valores son el promedio y sus desvíos estándares (n = 3).

Tabla III.2. Coeficientes de sedimentación de la PKA de *D.discoideum*, *M.rouxii*, *S.cerevisiae* y de mamífero.

Proteína	Organismo	S	Trabajo
C	D.discoideum	2,7	Majerfeld, I.H., 1984
	M.rouxii	3,2	Pastori, R. et al., 1985
	Mamífero	3,2	Zoller, M.J. et al., 1979
R	D.discoideum	3,5	de Gunzburg, J. & Veron, M., 1982
R’	M.rouxii	2,5	Paveto, C. et al., 1989
	RII mamífero	3,5	Rannels, S.R. et al., 1985
R_2	M.rouxii	6,1	Pastori, R. et al., 1985
	S. cerevisiae	5,0	Johnson, K.E. et al., 1987
	RI mamífero	4,7	Zoller, M.J. et al., 1979
	RII mamífero	4,7	Zoller, M.J. et al., 1979
RC	D.discoideum	4,4	de Gunzburg, J. et al., 1984
R’C	M.rouxii	4,5	Paveto, C. et al., 1989
	RII mamífero	5,5	Rannels, S. R. et al., 1985
R_2C_2	M.rouxii	8,4	Pastori, R. et al., 1985
	S. cerevisiae	7,0	Uno, I. et al., 1982
	Mamífero	7,5	Cobb, C.E. et al., 1987

(R`) Subunidad R luego de la digestión con tripsina.

III.2.2. Dimerización del dominio D/D de Bcy1

Una vez verificada la estructura cuaternaria de la holoenzima de *S.cerevisiae*, quisimos probar que la dimerización de las subunidades R se daba a través del dominio D/D predicho en extremo N-terminal.

El abordaje que se utilizó fue similar al utilizado en el apartado anterior: se estimó el coeficiente de sedimentación de la proteína Bcy1 wt y de su versión con los primeros 85 residuos delecionados (figura III.3 A).

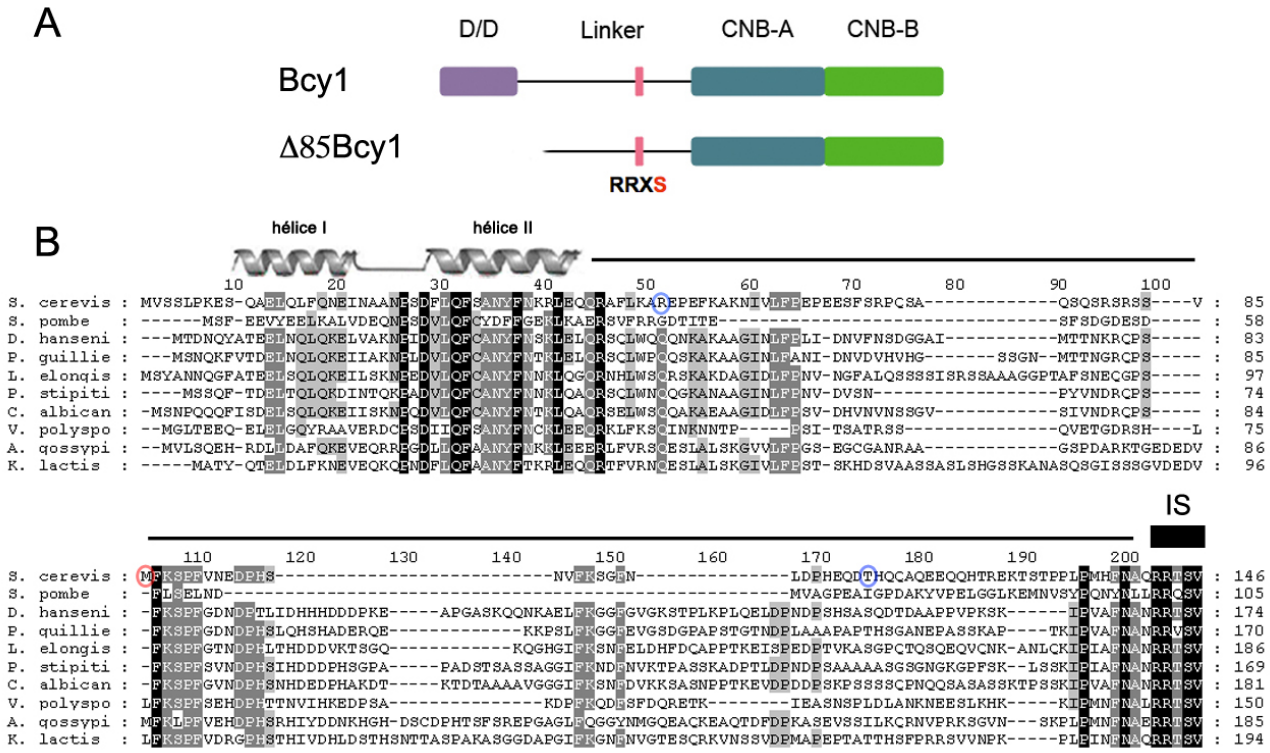


Figura III.3. A. Esquema de Bcy1 y Δ85Bcy1. B. Alineamiento del extremo N-terminal de algunas secuencias de subunidades R del grupo Saccharomycotina. La primera secuencia es la de Bcy1. Con un círculo azul se indican los residuos 50 y 125, que corresponden al extremo N-terminal de las construcciones del trabajo Griffioen, G. et al., 2000. Con un círculo rojo se indica el residuo 86, que corresponde al extremo N-terminal de la construcción utilizada en este experimento.

En levaduras los 124 primeros residuos de Bcy1 son suficientes y necesarios para la localización subcelular (Griffioen, G. et al., 2000). El dominio D/D predicho por el SMART corresponde a la región 7-45. La predicción de estructura secundaria indica que la hélice II se extiende hasta la posición 50. La deleción de los primeros 49 residuos, si bien afecta, no impide completamente la localización (Griffioen, G. et al., 2000). Esto indica que la región 49-124 participa en la localización de Bcy1 (figura III.3 B), región que está por fuera del dominio D/D clásico de mamíferos. Apoya la idea de que existen sitios por fuera del dominio D/D que participan en la interacción R-AKAP un

trabajo reciente en el cual se identificó un sitio adicional de unión a AKAPs en subunidades RI (Jarnæss, E. et al., 2008).

Hacia el extremo C-terminal de la hélice II se observa una región con cierto grado de conservación, que podría participar en la interacción con proteínas de anclaje (figura III.3 B). Por otro lado existen evidencias que indican que la región 100-145 participa en la interacción con la subunidad C (capítulo IV), lo cual sugiere que no participa en la dimerización ni en el anclaje. Teniendo en cuenta lo mencionado y con el fin de estudiar la dimerización y el anclaje a AKAPS, se decidió delecionar los primeros 85 residuos (Δ85Bcy1).

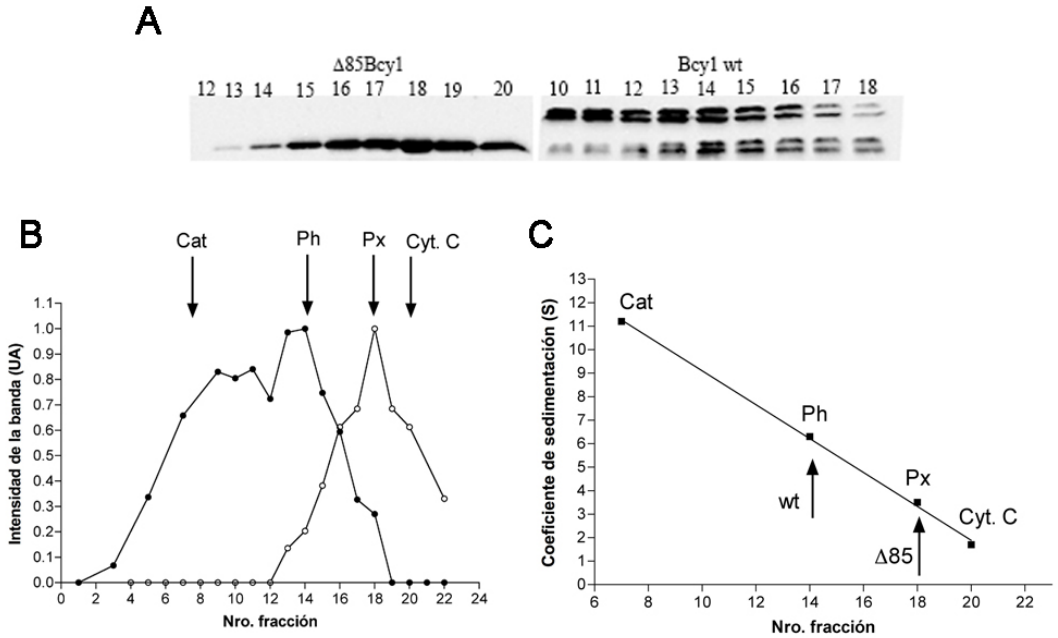


Figura III.4. Gradiente de sacarosa de lisados de cepas de levaduras que sobreexpresan Bcy1 y Δ85Bcy1. En cada fracción se estimó la cantidad de subunidad R wt (●) y Δ85 (○) (B) por cuantificación de la banda revelada por Western-blot utilizando el anticuerpo anti C-terminal de Bcy1 (A). C. Curva de calibración. Los gráficos muestran un experimento representativo.

Las proteínas Bcy1 y Δ85Bcy1 se sobreexpresaron en levaduras de la cepa KT1115 transformadas con los plásmidos YEp51-Bcy1 y Yep51-Δ85Bcy1. Los lisados celulares fueron sometidos a un gradiente de sacarosa 5-20% (p/v). Se analizó el contenido de Bcy1 en cada fracción por Western-blot (figura III.4.A), se compararon las movilidades en el gradiente de las dos proteínas recombinantes (figura III.4.B) y se estimaron los coeficientes de sedimentación (figura III.4.C y tabla III.3).

En el Western-blot de Bcy1 se detectaron varias bandas, mientras que en el Western-blot de Δ85Bcy1 se observó una única banda por fracción. Una de las dificultades más grandes con la que nos enfrentamos en el laboratorio es la inestabilidad de la región N-terminal a los sitios de unión a cAMP de Bcy1 (ver capítulo V), también reportada en subunidades R de otras especies. La

inestabilidad se debe a la proteólisis, ya que el patrón de bandas varía con el agregado de diferentes inhibidores de proteasas. En el Western-blot de Bcy1 se cuantificó el duplete de bandas de mayor PM.

Se observa un cambio de movilidad en los gradientes comparando ambas proteínas que no se explica por la simple diferencia en el PM, sino que evidencia que la región de los 85 residuos del extremo N-terminal contiene los elementos necesarios para la dimerización (figura III.4). El valor del coeficiente de sedimentación del dímero de R (tabla III.3) es similar al ya obtenido y al de dímeros de otros organismos (tabla III.2). El valor del coeficiente de sedimentación del monómero Δ85Bcy1 (tabla III.3) es similar a valores de la subunidad R generada por la digestión con tripsina de *M.rouxii* y de mamífero (tabla III.2).

Tabla III.3. Coeficientes de sedimentación.

Gradiente	S
Bcy1	5,9 ± 0,5
Δ85Bcy1	3,5 ± 0,5

Los valores son el promedio y sus desvíos estándares (n = 3).

Los resultados nos permiten concluir que la región de los 85 residuos del extremo N-terminal de Bcy1 contiene los elementos necesarios para la dimerización.

III.2.3. Interacción *in vitro* del extremo N-terminal de Bcy1 con el AKB de la AKAP D-AKAP2

En mamíferos la dimerización es un requisito para la unión de AKAPs, pues la estructura del dímero provee la superficie de interacción con las AKAPs. Sabiendo ahora que el extremo N-terminal de Bcy1 participa en la dimerización nos preguntamos si es también capaz de unirse a proteínas de anclaje. Como ya se ha mencionado anteriormente no se han identificado proteínas de anclaje en levaduras a pesar de que se sabe que Bcy1 se localiza en determinados compartimentos subcelulares. A falta de AKAP homóloga, nos propusimos estudiar la interacción heteróloga entre el extremo N-terminal de Bcy1 y el dominio AKB de la AKAP D-AKAP2 murina.

D-AKAP2 es una AKAP dual que une tanto RI como RII. Tiene tres dominios RGS (*regulator of G protein signaling*) putativos, un dominio AKB y un motivo de unión a PDZ (Burns-Hamuro, L.L. et al., 2004) (figura III.5). Los dominios RGS se unen a la subunidad Gα, modulando negativamente su actividad (Kozasa, T & Ye, D.G., 2004). Los dominios PDZ fueron identificados originalmente como elementos conservados presentes en tres proteínas: PSD95/SAP90, DLG y ZO-1. Los dominios PDZ son dominios de unos 90 aminoácidos que se unen al motivo de unión a PDZ en el extremo C-terminal de las proteínas interactoras. Una proteína contiene en general más de un

dominio PDZ, cada uno de los cuales se une a diferentes proteínas. Las proteínas que contienen dominios PDZ frecuentemente son parte de los complejos proteicos involucrados en la transducción de señales (Suh, P. et al., 2001).

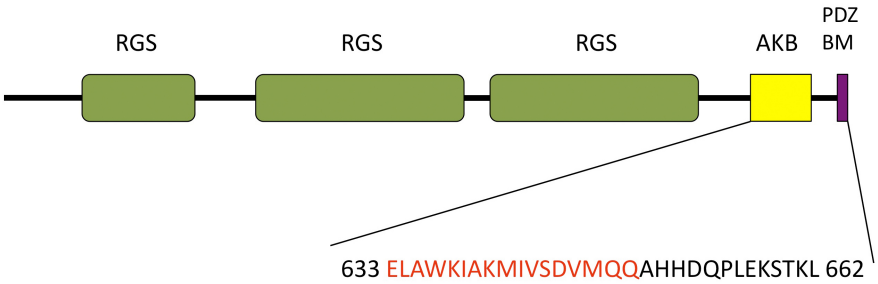


Figura III.5. Esquema de D-AKAP2. Contiene tres dominios putativos RGS, un motivo de unión a PDZ y el dominio AKB, el cual forma una hélice anfipática (en rojo) que se une al dominio D/D de la subunidad R. Se muestra la secuencia de la región de la AKAP con la que se trabajó.

Se estudió la interacción *in vitro* a través de la técnica de *pull-down*. Se inmobilizó la proteína de fusión conteniendo la región 633-662 de la D-AKAP2 (figura III.5) fusionada a GST en una resina de glutatión. Se la incubó con Bcy1 y Δ85Bcy1 purificadas y se analizó por Western-blot la presencia de Bcy1 en la resina. Se hicieron controles negativos con GST sola (figura III.6).

Bcy1 y no Δ85Bcy1 quedó inmobilizada en la resina de glutatión incubada previamente con la proteína GST-AKB (figura III.6). Este resultado demuestra que el extremo N-terminal de Bcy1 interacciona con el dominio AKB de la D-AKAP2.

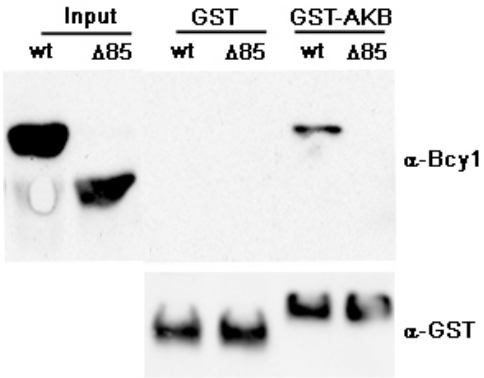


Figura III.6. Ensayo de interacción *in vitro* del extremo N-terminal de Bcy1 y el dominio AKB de la AKAP D-AKAP2. Cantidades iguales de Bcy1 y Δ85Bcy1 purificadas se incubaron con las proteínas GST y GST-AKB inmobilizadas. Se muestran los Western-blots revelados con anticuerpo anti-C-terminal de Bcy1 y con anticuerpo anti-GST de la fracción inmovilizada y de una alícuota de Bcy1 y de Δ85Bcy1 equivalente al 10% de lo puesto a incubar. Se muestra un experimento representativo (n = 3).

III.3. Conclusiones

En este capítulo concluímos que la holoenzima de *N.crassa*, cuya subunidad no presenta dominio de D/D predicho es un dímero compuesto por una subunidad R y una subunidad C. Es posible que esta característica no sea una particularidad de *N.crassa* sino una característica común de la *Subfilum* Pezizomycotina de la *Filum* Ascomycetes, a cuyas subunidades R no se les predice dominio D/D (figura III.7). La misma estructura cuaternaria ha sido reportada para la PKA del hongo *Saccobolus platensis*, perteneciente al mismo grupo (Silberstein, S. et al., 1990).

Por otro lado verificamos resultados publicados que apoyaban la idea de que la holoenzima de *S.cerevisiae* es un tetrámero, formado por un dímero de subunidades R y dos subunidades C (figura III.7).

Arribamos a estas conclusiones sobre la estructura cuaternaria la PKA de *S.cerevisiae* y *N.crassa* estimando los coeficientes de sedimentación de las holoenzimas y sus componentes.

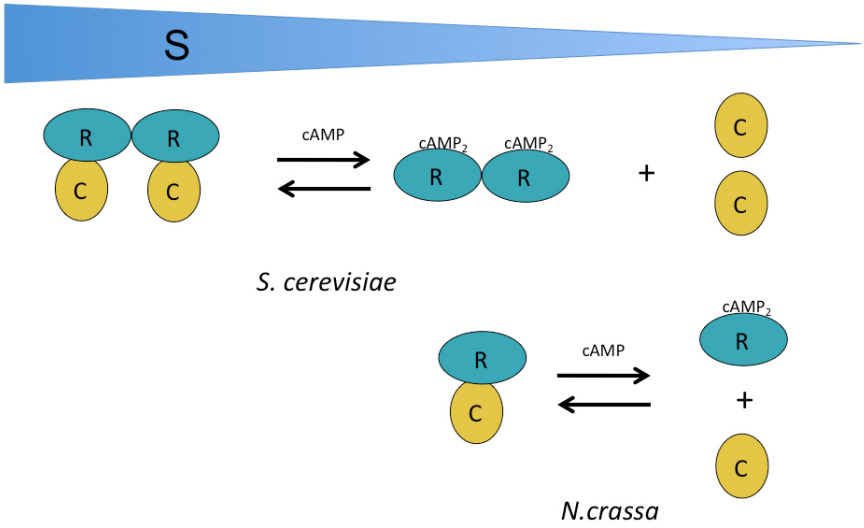


Figura III.7. Esquema de las holoenzimas de *S.cerevisiae* y *N.crassa*. Como se indica en la parte superior la posición de las moléculas en la figura corresponde al valor de su coeficiente de sedimentación: decrece de izquierda a derecha.

Finalmente comprobamos la funcionalidad del dominio D/D de Bcy1 en el extremo N-terminal, tanto su habilidad para dimerizar como para interaccionar con proteínas AKAPs. Es importante aclarar que cuando decimos dominio D/D en Bcy1 nos estamos refiriendo a una región todavía no delimitada exactamente, pero que sabemos que se extiende más allá de los primeros 49 residuos –correspondientes a las hélices I y II- y que está contenida en los primeros 85 residuos (figura III.3).

CAPITULO IV:
ZONA BISAGRA

IV.1. Introducción y objetivos específicos

Como hemos visto en el capítulo II la zona bisagra de la subunidad R es una región muy variable, en especial el *linker I*. La zona bisagra en general y en particular el *linker I* es una región rica en zonas de baja complejidad. Estas regiones repetitivas son generalmente no globulares y en algunos casos pueden participar en la transición de estructura desordenada a ordenada como ocurre con regiones que participan en interacciones proteína-proteína. Se ha demostrado que justamente esto es lo que sucede con el *linker II*: región completamente desordenada en la estructura de R unida a cAMP que se ordena al unirse a la subunidad C en mamíferos (Su, Y. et al., 1995; Diller, T.C. et al., 2001; Kim, C. et al., 2005; Kim, C. et al., 2007, Wu, J. et al., 2007).

La afinidad entre la subunidad C y la R varía de especie en especie. La afinidad R-C en *S.cerevisiae* es menor que en el sistema de mamíferos (Kuret, J. et al., 1988). Como se ha mencionado en el capítulo I la PKA de *Mucor* tiene la particularidad de no disociarse con el simple agregado de cAMP. Sin embargo, el agregado simultáneo de cAMP y altas concentración de sales o policationes permite la disociación de la holoenzima, sugiriendo que la interacción es de tipo iónica.

Se ha observado por experimentos de fluorescencia y de resonancia de plasmón superficial que la región de 20 aminoácidos hacia el extremo N-terminal del IS forma parte de la superficie de interacción entre las subunidades R y C de mamíferos, tanto para el heterodímero R-C de tipo de I como para el de tipo II (Li, F. et al., 2000; Cheng, X. et al., 2001). El inhibidor de proteína quinasa (PKI) al igual que la subunidad R tiene un sitio de pseudosustrato que se une al bolsillo catalítico de la subunidad C. La región N-terminal al sitio de pseudosustrato del PKI es también importante para la interacción con la subunidad Cα (Knighton, D.R. et al., 1991b).

El objetivo de este capítulo es evaluar la participación del *linker I* en la interacción R-C en *S.cerevisiae* y *M.rouxii*. Las hipótesis que se plantearon son las siguientes: (1) el *linker I* participa en la interacción R-C y (2) esta zona de interacción es responsable de las diferencias observadas en la afinidad entre ambas subunidades entre *Mucor*, *S.cerevisiae* y mamíferos.

Para contestar estas preguntas comparamos el efecto de diferentes péptidos derivados de la secuencia de la zona bisagra de las subunidades R de *M.rouxii* y de *S.cerevisiae* sobre el comportamiento cinético de las subunidades C de *M.rouxii*, *S.cerevisiae* y de *B.taurus*. Se evaluó el efecto de los péptidos sobre su propia fosforilación (péptidos sustrato) y sobre la fosforilación del kemptido (péptidos pseudosustrato).

Una vez comprobada la participación del *linker I* en la interacción R-C, nos preguntamos qué efecto

tiene dicha interacción en la actividad de la subunidad C.

La caracterización del efecto de la interacción *linker I*-C en la actividad de la enzima se realizó con una aproximación de cinética enzimática en dónde se evaluó el efecto de péptidos derivados de la zona bisagra de la subunidad R sobre la fosforilación de sustratos peptídicos y proteínas sustrato naturales.

IV.2. Resultados

IV.2.1. Rango lineal temporal y de concentración de enzima

Con el fin de evaluar la participación del *linker I* en la interacción R-C nos propusimos comparar el efecto de varios péptidos derivados de la secuencia del *linker I* de la subunidad R de *M.rouxii* (R_{Mr}) y de *S.cerevisiae* (R_{Sc}) sobre la actividad fosforilante de las subunidades C de *M.rouxii* (C_{Mr}), *S.cerevisiae* (C_{Sc}) y *B.taurus* (C_b).

Se purificaron las subunidades C de *M.rouxii* y de *S.cerevisiae*. La subunidad C de *B.taurus* purificada fue cedida por la Dra. Susan Taylor, de la Universidad de California, San Diego.

El primer paso, una vez obtenidas las enzimas fue la puesta a punto de la concentración de enzima y del tiempo de incubación de la reacción. Como ya se mencionó en la capítulo I, para lograr el estado estacionario el número de moléculas de sustrato debe estar en exceso con respecto al número de moléculas de enzima; la enzima debe estar en una concentración dentro del rango lineal y la reacción debe ser medida dentro del rango temporal lineal (Coperland, R.A., 2000).

Se evaluó la actividad quinasa de diferentes cantidades de las subunidades C de *M.rouxii*, *S.cerevisiae* y *B.taurus* utilizando concentraciones saturantes de kemptido (500 μM) como sustrato. La reacción se incubó por 5 min (figura IV.1). A partir de este experimento se eligieron las cantidades de enzima con las que se trabajó: 5 μl de preparación de C_{Mr} y C_{Sc} (alrededor de 0,5 μg de proteína total) y 0,15 ng de C_b.

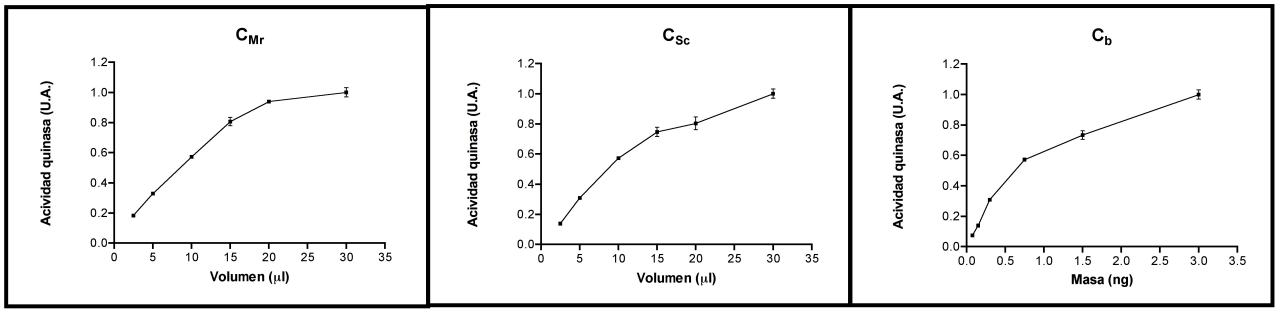


Figura IV.1. Actividad quinasa de C_{Mr}, C_{Sc} y C_b de diferentes cantidades de enzima. El sustrato es kemptido (500 μM). Se incubó por 5 min. En el gráfico correspondiente a C_b la cantidad está expresada en masa. En los gráficos correspondientes a C_{Mr} y C_{Sc} la cantidad de enzima está expresada como volumen de la preparación de enzima.

Luego se evaluó el rango lineal temporal a la concentración de enzima elegida, utilizando concentraciones saturantes de kemptido (500 μM) como sustrato (figura IV.2). A partir de este experimento se decidió incubar la reacción por 5 min.

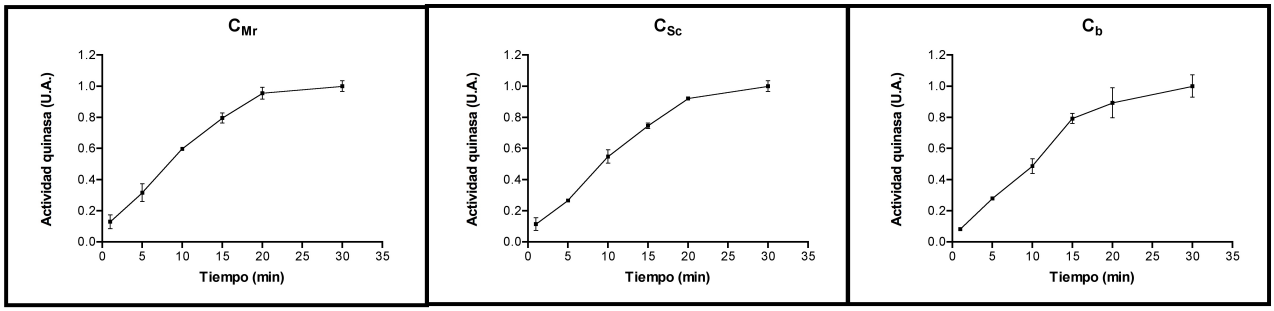


Figura IV.2. Actividad quinasa de C_{Mr}, C_{Sc} y C_b a diferentes tiempos de incubación. El sustrato utilizado es kemptido (500 µM).

IV.2.2. Parámetros cinéticos de estado estacionario de péptidos sustrato

La secuencia de los péptidos con los que se trabajó corresponde al IS más una zona variable hacia el extremo N-terminal de R_{Mr} y R_{Sc}, entre las posiciones P-42 y P+4 (tomando como 0 la posición de la Ser fosforilable) (tabla IV.1). Elegimos esta región porque presenta importantes diferencias en las dos subunidades R en cuanto a la naturaleza química de los aminoácidos (figura II.3). En *M.rouxii* (al igual que en *M.circinelloides*) esta región es rica en aminoácidos ácidos. Algunos péptidos son fosforilables ya que (al igual que la subunidad R) llevan una Ser en el IS; mientras que en otros la Ser ha sido reemplazada por una Ala.

Tabla IV.1. Péptidos sintéticos derivados de R_{Mr} y R_{Sc}.

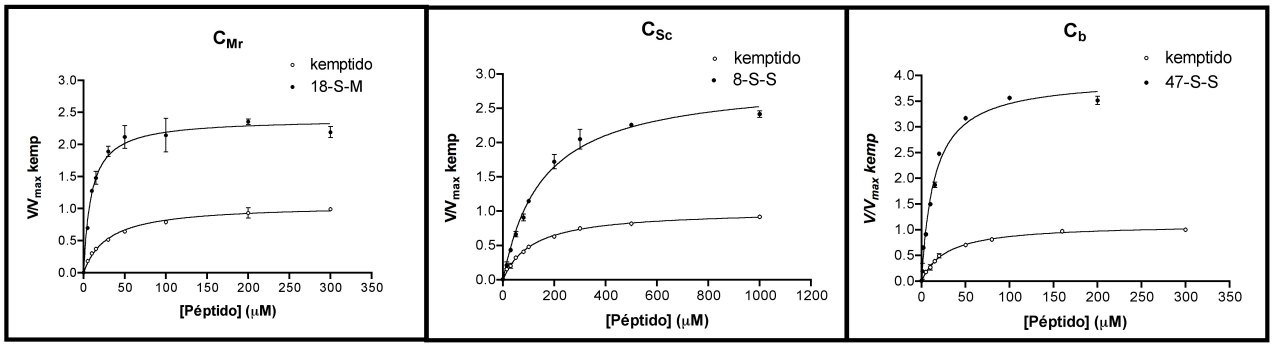
Nombre	Secuencia	Organismo
8-S-M	RRTSVSAE	*M.rouxii*
8-S-S	RRTSVSGE	*S.cerevisiae*
18-S-M	FPSSSFGTRNRRTSVSAE	*M.rouxii*
18-S-S	PPLPMHFNAQRRTSVSGE	*S.cerevisiae*
18-A-M	FPSSSFGTRNRRTAVSAE	*M.rouxii*
18-A-S	PPLPMHFNAQRRTAVSGE	*S.cerevisiae*
47-S-M	ESERMMAQHEDNDEEEEKDHFSTNTPLNAFPSSSFGTRNRRTSVSAE	*M.rouxii*
47-S-S	SGFNLDPHEQDTHQQAQEEQQHTREKTSTPPLPMHFNAQRRTSVSGE	*S.cerevisiae*
10Nt-M	FPSSSFGTRN	*M.rouxii*
NRP1	IRTGRTLNDR	
NRP2	LKKGDTYVSI	
kemptido	LRRASLG	*S.scrofa*

Nomenclatura: El número corresponde al largo del péptido. La primera letra indica si el péptido tiene Ser o Ala en la posición fosforilable. La segunda letra indica el organismo de origen.

Nuestra idea inicial era comparar la afinidad de los complejos subunidad C-péptidos no fosforilables estimando la constante de inhibición (K_i) de la fosforilación de kemptido. Supusimos que los péptidos no fosforilables se comportarían como inhibidores del kemptido. La K_i es un buen estimador de la afinidad ya que refleja la unión del péptido a la enzima (K_d). Para nuestra sorpresa, los péptidos no fosforilables no se comportaron como inhibidores sino que tenían un efecto dual: inhibían a altas concentraciones y activaban cuando la relación péptido no fosforilable/kemptido era baja (figura IV.7).

Decidimos entonces cambiar de estrategia. Nos propusimos estimar los parámetros cinéticos de estado estacionario de la version fosforilable de los péptidos. Esta aproximación tiene la desventaja de poner en juego no sólo la unión del complejo péptido-subunidad C, que es lo que nos interesaba a nosotros, sino también la catálisis.

Estimamos la K_m y la V_{max} relativa a la V_{max} del kemptido (de ahora en más llamaremos a este parámetro k_{cat} *relativa*) para la fosforilación de seis péptidos sustratos, 8-S-M, 8-S-S, 18-S-M, 18-S-S, 47-S-M y 47-S-S, por parte de las tres subunidades C, C_{Mr}, C_{Sc} y C_b (figura IV.3 y 4 y tabla IV.2). Expresamos los resultados como k_{cat} *relativa* en lugar de k_{cat} para poder comparar este parámetro entre experimentos, debido a que no podemos estimar la concentración de C_{Mr} y C_{Sc}.



Figua IV.3. Curvas de sustrato correspondientes a las tres subunidades C. Se muestran algunas curvas a modo de ejemplo. La actividad está relativizada a la V_{max} del kemptido. Las líneas corresponden al ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten. Las barras de error corresponden a los duplicados.

Una primera observación derivada del análisis de los datos de la figura IV.4 es que los valores de K_m de las subunidad C de hongos para los péptidos 8-S-S son mayores que para C_b; sin embargo, para los péptidos más largos (18-S y 47-S) todas las enzimas tienen valores de K_m parecidos. Se reportaron anteriormente diferencias en el mismo sentido en la K_m de C_{Mr} y C_{Sc} con respecto a C_b para otros péptidos similares a los 8-S (Zaremberg, V. et al., 2000; Portela, P. et al., 2006; Denis, C.L. et al., 1991). Las diferencias observadas para los péptidos cortos (8-S) no reflejan la interacción zona bisagra-subunidad C ya que no se mantiene para los péptidos más largos. Un comportamiento similar mostró la piruvato quinasa 1 de *S.cerevisiae* (Pyk1), un sustrato de la PKA: su K_m no difiere entre C_{Sc} y C_b, a pesar de la diferencia observada entre las subunidades C para un péptido derivado del sitio de fosforilación de Pyk1 y para el kemptido (Portela, P. et al., 2006).

Una segunda observación derivada de la figura IV.4 es que las tres subunidades C presentan el siguiente comportamiento general: la k_{cat} *relativa* crece y la K_m decrece con la longitud del péptido. La consecuencia es un incremento general en la constante de eficiencia catalítica (K_{sp}*) con la longitud del sustrato. La K_{sp}* se caculó como el cociente entre los valores promedios de la k_{cat}

relativa y la K_m derivados de la figura IV.4 y de la tabla IV.2 (tabla IV.3). El grado de cambio en estos parámetros para cada subunidad C es diferente.

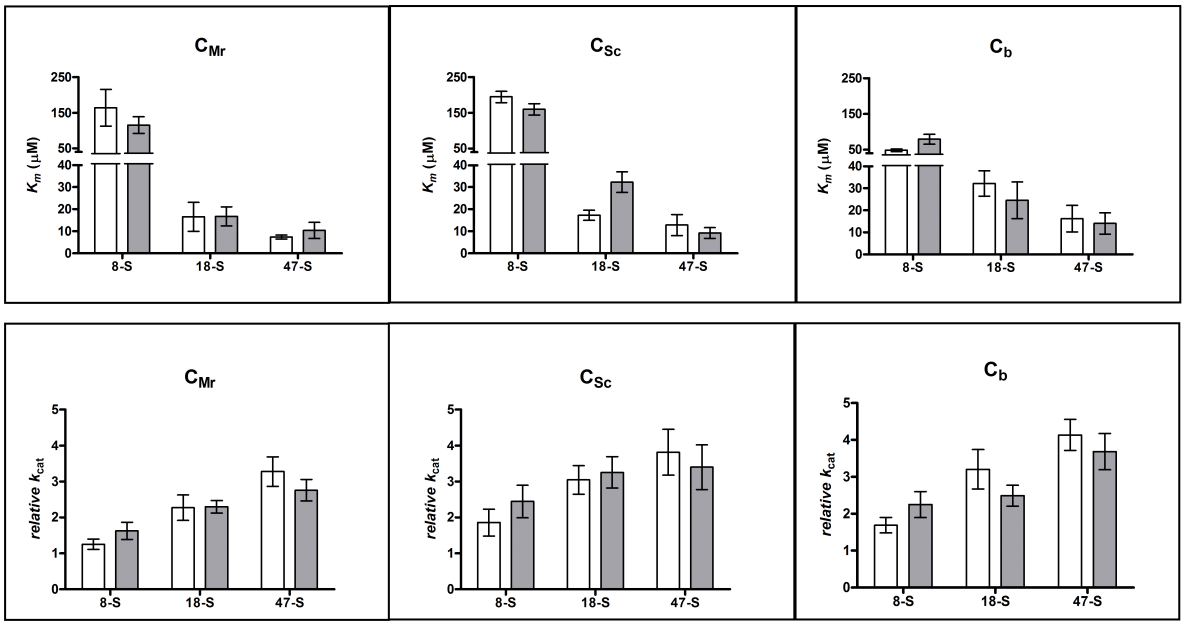


Figura IV.4. Parámetros cinéticos de estado estacionario de los péptidos sustrato 8-S-M, 8-S-S, 18-S-M, 18-S-S, 47-S-M y 47-S-S por parte de C_{Mr}, C_{Sc} and C_b. Se estimaron K_m y k_{cat} *relativa* a partir de curvas como las de la figura IV.3. Las barras blancas representan a los péptidos derivados de la secuencia de subunidad R de *M.rouxii* y las barras grises representan a los péptidos derivados de la secuencia de la subunidad R de *S.cerevisiae*. La k_{cat} *relativa* se define como la V_{max} del péptido/V_{max} del kemptido. Los valores corresponden a los promedios y las barras de error a los desvíos estándares (n = 3).

Tabla IV.2. K_m de los péptidos sustrato para C_{Mr}, C_{Sc} y C_b.

Péptido	C_{Mr} (µM)	C_{Sc} (µM)	C_b (µM)
kemptido	34 ± 4 (23)	89 ± 8 (12)	22 ± 3 (10)
8-S-M	164 ± 51 (3)	195 ± 16 (3)	48 ± 4 (3)
8-S-S	116 ± 23 (3)	160 ± 16 (3)	80 ± 14 (3)
18-S-M	17 ± 7 (3)	17 ± 2 (3)	32 ± 6 (3)
18-S-S	17 ± 4 (3)	32 ± 5 (3)	25 ± 8 (3)
47-S-M	7 ± 1 (3)	13 ± 5 (3)	16 ± 6 (3)
47-S-S	10 ± 4 (3)	9 ± 2 (3)	14 ± 5 (3)

Los valores son expresados como promedio ± desvío estándar.
Los números entre paréntesis indican el número de replicas.

Tabla IV.3. Eficiencia catalítica de C_{Mr}, C_{Sc} y C_b para los péptidos sustratos.

Péptido	K_{sp}*		
	C_{Mr}	C_{Sc}	C_b
8-S-M	0.008	0.010	0.035
8-S-S	0.014	0.015	0.028
18-S-M	0.138	0.176	0.099
18-S-S	0.137	0.101	0.101
47-S-M	0.444	0.297	0.254
47-S-S	0.266	0.370	0.261

La eficiencia catalítica (K_{sp}*) fue calculada como el cociente entre los valores promedios de la k_{cat} *relativa* y el valor promedio de la K_m (µM) de cada péptido sustrato, que se muestran en la figura IV.4 y en la tabla IV.2.

En la figura IV.5 se muestra la K_{sp}* *relativa* de cada subunidad C comparando los datos de los péptidos más largos 18-S y 47-S (de la serie *M.rouxii* o de la serie *S.cerevisiae*) con sus respectivos péptidos 8-S. Se observa que el incremento en eficiencia catalítica con la longitud del péptido de C_{Mr} y C_{Sc} es de 60 y 30 veces, respectivamente; mientras que el cambio para C_b no alcanza las 10 veces. La ganancia de eficiencia catalítica para las enzimas fúngicas correspondiente a la región P-4 a P-13 es mayor que la correspondiente a la región P-14 a P-42: el cociente de eficiencias 18-S/8-S es 6,6 y 18,5, mientras que el cociente 47-S/18-S es 1,7 y 3,7 para C_{Sc} y C_{Mr}, respectivamente. Tanto C_{Mr} como C_{Sc} tienen preferencia por 18-S-M sobre 18-S-S (la eficiencia relativa es mayor para 18-S-M que para 18-S-S). Esto sugiere que la región P-4 a P-13 podría ser responsable en parte de las diferencias observadas en la afinidad R-C en las distinitas especies. Se ha reportado que una Arg en la posición P-6 del PKI es importante para la unión con la subunidad Cα (Knighton, D.R. et al., 1991b; Reed, J. et al., 1989). Esto nos hace pensar que la Arg en la posición P-5 del péptido 18-S-M podría ser responsable de la mayor eficencia catalítica. Aunque la contribución es menor, la región P-14 a P-42 presenta una selectividad especie-específica ya que los cocientes 47-S/18-S son mayores en el sistema homólogo (péptidos derivados de subunidad R y subunidad C del mismo organismo). Esto indicaría que tanto esta región de la subunidad R como la superficie interactuante en la subunidad C son responsables de las diferencias observadas en la afinidad R-C entre especies. En un trabajo simultáneo del laboratorio se demostró que la deleción de la región P-14 a P-42 de la subunidad R de *Mucor circinelloides* disminuye la interacción con la subunidad C homóloga, pero no disminuye la interacción con la subunidad C_b (Ocampo, J. et al., 2007).

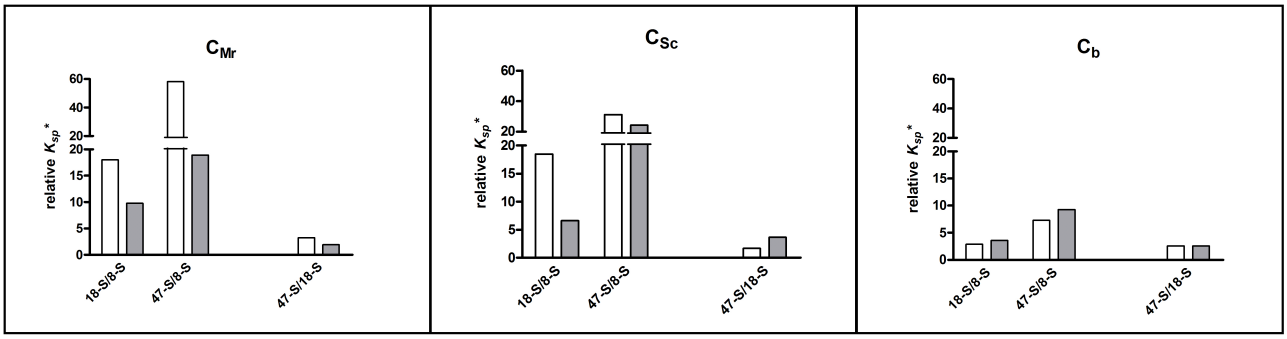


Figura IV.5. Eficiencias catalíticas relativas de C_{Mr}, C_{Sc} y C_b para los péptidos sustratos. La eficiencia catalítica relativa (K_{sp}* *relativa*), definida como el cociente de K_{sp}* de diferentes péptidos del mismo origen, fue calculado de la tabla IV.3. Las barras blancas representan a los péptidos derivados de la secuencia de la subunidad R de *M.rouxii* y las barras grises representan a los péptidos derivados de la secuencia de la subunidad R de *S.cerevisiae*.

La variación de los parámetros cinéticos con la longitud del péptido observada sugiere que tanto en la holoenzima de *M.rouxii* como en la de *S.cerevisiae* la región P-4 a P-42 participa en la interacción R-C, siendo más importante la contribución de la región P-4 a P-13.

No se han encontrado grandes diferencias entre los péptidos derivados de la subunidad R de *M.rouxii* y los derivados de la subunidad R de *S.cerevisiae* que justifiquen la diferencia en la afinidad R-C.

IV.2.3. Efecto de la viscosidad en los parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos de estado estacionario K_m y k_{cat} *relativa* observados con C_{Mr} y C_{Sc} se comportan de acuerdo al modelo del *clamp* propuesto por el grupo del Dr. Joseph Adams para proteínas quinasas, mencionado en el capítulo I (Lieser, S.A. et al., 2005). Este modelo explica la disminución de la K_m y el aumento de la k_{cat} de un sustrato proteico, comparado con un péptido derivado del sitio de fosforilación, a través del acoplamiento termodinámico de los pasos de unión del sustrato y de transferencia del fosfato, debido a interacciones por fuera del sitio catalítico que afectan la catálisis. De acuerdo al modelo de *clamp* la velocidad de transferencia de fosfato de los péptidos largos debería ser mayor que la correspondiente a los péptidos cortos, de manera tal que en el caso de los péptidos cortos la transferencia de fosfato determine completamente la reacción, mientras que en el caso de los péptidos largos no lo haga o lo haga parcialmente. Para probar esta hipótesis evaluamos el efecto de la viscosidad sobre los parámetros cinéticos.

Como se mencionó en el capítulo I, se espera un gran efecto de la viscosidad en la k_{cat} si la liberación de ADP es el paso limitante, mientras que si la trasferencia de fosfato determina la reacción se espera que la viscosidad no afecte la k_{cat}.

El experimento se llevó a cabo con el sistema de *M.rouxii*: subunidad C_{Mr} y los péptidos 8-S-M, 18-S-M, 47-S-M y kemptido (figura IV.6 A y B). Este tipo de experimentos requiere cantidades de enzima un poco mayores a las que veníamos utilizando. Por este motivo cambiamos el método de purificación. Se utilizó también la subunidad C_b, como referencia, ya que el dato del efecto de la viscosidad sobre la k_{cat} del sistema kemptido C_b es conocido. El motivo por el cual este experimento no se realizó con el sistema de *S.cerevisiae* es que no logramos mejorar la calidad de la preparación de C_{Sc}.

El efecto de la viscosidad se evalúa a través de la pendiente del gráfico del cociente entre la k_{cat} obtenida en ausencia de glicerol y la obtenida en presencia de glicerol vs la viscosidad relativa del medio (tabla IV.4). Como se menciona en el capítulo I una pendiente 0 indica que no hay efecto de la viscosidad, es decir que el paso limitante es la transferencia de fosfato, mientras que un valor de 1 indica que el efecto es máximo o dicho de otro modo que la liberación de ADP es limitante. Valores de pendiente intermedios implican que la transferencia de fosfato y la liberación de producto son parcialmente limitantes.

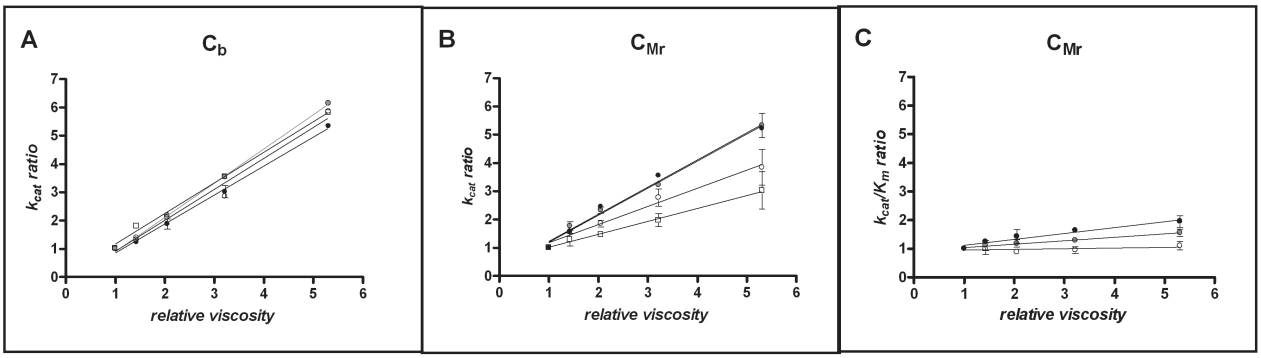


Figura IV.6. Efecto de la viscosidad del medio en los parámetros cinéticos. La k_{cat} de C_b (A), la k_{cat} de C_{Mr} (B) y la k_{cat}/K_m de C_{Mr} (C) fueron estimados en ausencia y en presencia de cantidades variables de glicerol, utilizando los sustratos kemptido (cuadrados blancos), 8-S-M (círculos blancos), 18-S-M (círculos grises) y 47-S-M (círculos negros). Se grafican los cocientes de k_{cat} y de k_{cat}/K_m obtenidos en ausencia/presencia de viscógeno en función de la viscosidad relativa. Las líneas corresponden al ajuste lineal. Las barras de error corresponden a los duplicados. Se muestra un experimento representativo (n = 3).

Tabla IV.4. Pendientes obtenidas de la figura IV.4.

	k_{cat} C_b	k_{cat} C_{Mr}	k_{cat}/K_m C_{Mr}
kemptido	1 ± 0,1	0,5 ± 0,1	ND
8-S-M	1 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0 ± 0,1
18-S-M	1 ± 0,1	1 ± 0,2	0,1 ± 0,1
47-S-M	1 ± 0,2	1 ± 0,2	0,2 ± 0,1

Los valores son el promedio y sus desvíos estándares (n = 3). ND: no determinado.

Las pendientes para la subunidad C_{Mr} correspondientes al kemptido y al péptido 8-S-M (figura IV.6 A y tabla IV.4) indican que el efecto de la viscosidad es intermedio, mientras que para los péptidos 18-S-M y 47-S-M el efecto es máximo. Para la subunidad C_b (figura IV.6 B y la tabla IV.4) el efecto sobre la k_{cat} es máximo para los cuatro péptidos. El efecto máximo de la viscosidad sobre la k_{cat} de C_b utilizando kemptido como sustrato ya ha sido descripto. Experimentos de pre-estado estacionario sugieren que la transferencia de fosfato es muy rápida (Lieser, S.A. et al., 2005).

Estos resultados nos permiten concluir que contactos por fuera del IS aceleran la transferencia de fosfato de la subunidad C_{Mr}.

El modelo de *clamp* propone que la disminución de la K_m con la longitud del péptido no va acompañada de una disminución de la K_d de igual magnitud. Una manera (aunque parcial) de evaluar la K_d es a través de la velocidad de disociación (k_{-1}). Como se explica en la introducción la relación entre la k_{cat}/K_m y la viscosidad nos da información acerca de la velocidad k_{-1}. Se evaluó el efecto de la viscosidad sobre k_{cat}/K_m para la subunidad C_{Mr} utilizando como sustratos 8-S-M, 18-S-M y 47-S-M (figura IV.4 C). Los valores de las pendientes (tabla IV.4) son 0, 0,1 y 0,2 para 8-S-M, 18-S-M y 47-S-M, respectivamente, lo cual indica que la k_{-1} de los diferentes sustratos no varía sustancialmente, al menos no es el paso limitante ni para los péptidos cortos ni para los largos.

La comparación de los parámetros cinéticos de los péptidos para las subunidades C_{Mr} y C_b y los experimentos de viscosidad se pueden entender bajo la misma idea. Para C_{Mr} la transferencia de fosfato y la liberación de ADP contribuyen al *turnover* de la enzima cuando el sustrato es un péptido corto. La tasa de transferencia de fosfato es mayor cuando el péptido incluye parte del *linker*, de manera tal que la liberación de ADP limita la reacción. Este aumento en la tasa de transferencia de fostato se produciría a través de contactos por fuera del sitio catalítico. Creemos que este comportamiento también lo presenta la subunidad C_{Sc}, teniendo en cuenta los valores de los parámetros cinéticos K_m y k_{cat} *relativa*.

IV.2.4. Efecto dual de los péptidos no-fosforilables

Como ya se ha mencionado nuestra idea inicial para estudiar la participación de la zona bisagra en la interacción R-C era trabajar con péptido no fosforilables. Esperábamos encontrar una inhibición de la fosforilación del kemptido. Sin embargo los péptidos 18-A-M y 18-A-S mostraron un comportamiento dual: activación cuando la relación péptido no fosforilable/kemptido era baja e inhibición cuando la relación era alta (figura IV.7). Las tres subunidades C mostraron el mismo comportamiento.

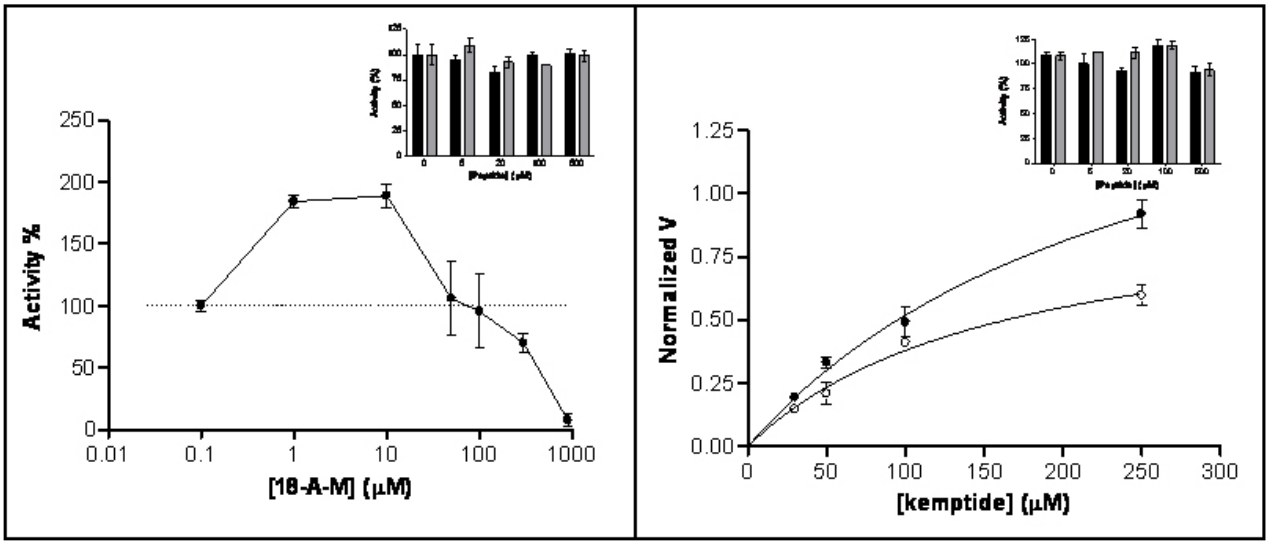


Figura IV.7. Efecto de los péptidos 18-A sobre la fosforilación del kemptido. (A). Efecto de péptido 18-A-M (kemptido 100 μM) sobre la fosforilación por C_{Mr}; el 100% corresponde a la actividad en ausencia de 18-A-M. (B). Efecto del péptido 18-A-S sobre la fosforilación por C_{Sc}, en ausencia (○) y en presencia (●) de 18-A-S 6 μM. Las líneas representan el ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten. Los valores del eje *y* corresponden a la velocidad de reacción relativa a la V_{max} en ausencia de 18-A-S. El gráfico de barras en el ángulo superior derecho de los paneles A y B corresponden al experimento control con péptidos no relacionados. Se ensayó el efecto de NRP1 (barras negras) y NRP2 (barras grises) sobre la fosforilación del kemptido (concentración saturante) por C_{Mr} (A) and C_{Sc} (B). El rango de concentraciones de péptidos NRP fue de 0-500 μM. Los gráficos muestran un experimento representativo. Las barras de error corresponden a los duplicados. (n = 3)

Para verificar la especificidad del efecto de los péptidos 18-A-M y 18-A-S se evaluó el efecto de dos péptidos no relacionados, NRP1 y NRP2 (tabla IV.1 y gráficos de barras insertos en la figura IV.7). Ninguno de los dos péptidos tuvo efecto.

Los péptidos que corresponden al IS son inhibidores competitivos (Whitehouse, S. et al., 1983). Esto nos lleva a pensar que la región de los péptidos 18-A responsable del efecto activador es la región N-terminal. Evaluamos el efecto del péptido correspondiente a la región de 10 aminoácidos N-terminal del péptido 18-A-M, llamado 10Nt-M (tabla IV.1) sobre la fosforilación del kemptido por parte de C_{Mr} (figura IV.8). Se observó una activación de 2,5 a 3 veces. Este resultado muestra que la interacción de esta región de la subunidad R y la subunidad C genera un aumento de la actividad.

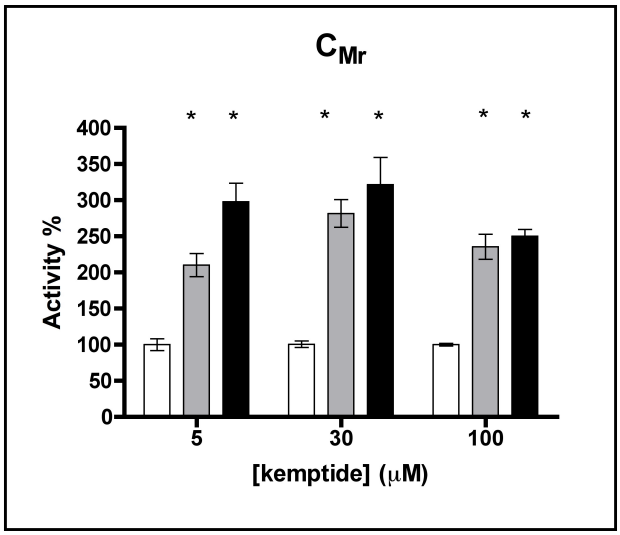


Figura IV.8. Efecto de 10Nt-M sobre la fosforilación del kemptido por C_{Mr}. Se midió la actividad a 5, 30 y 100 μM de kemptido en ausencia (barras blancas) y en presencia de 25 μM (baras grises) y de 100μM (barras negras) de 10Nt-M. El gráfico muestra un experimento representativo. Las barras de error corresponden a los duplicados. Los asteriscos indican las diferencias significativas ($p<0,01$) con respecto a los experimentos control (sin 10Nt-M).

Para determinar si los péptidos son capaces de activar no sólo la fosforilación de péptidos sino también de sustratos proteicos naturales, evaluamos el efecto del péptido 18-A-S sobre la fosforilación de la piruvato quinasa 1 de *S.cerevisiae* (Pyk1) por parte de la subunidad C_{Sc}. Se midió la fosforilación de concentraciones saturantes de Pyk1 (40 μM) por parte de C_{Sc} en ausencia y en presencia de 18-A-S (figura IV.9). En el rango 3-75 μM se observa una activación de 2 veces, similar a la observada cuando el sustrato era el kemptido (figura IV.7). Concentraciones más altas producen inhibición.

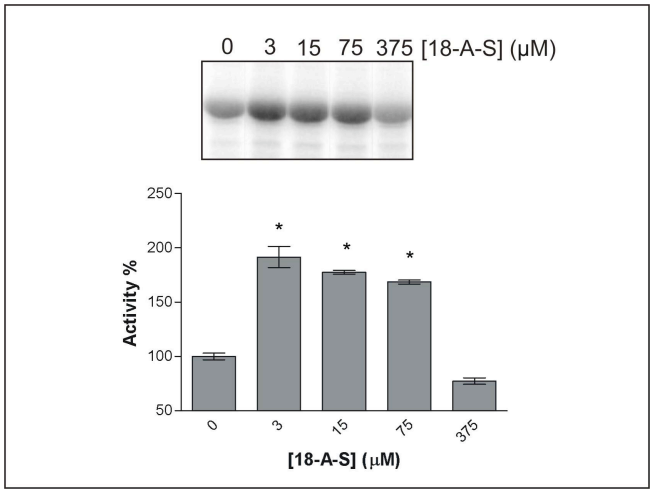


Figura IV.9. Efecto de 18-A-S sobre la fosforilación de Pyk1 por parte de C_{Sc}. Se midió la actvidiad de C_{Sc} a concentraciones saturantes de Pyk1 (40 μM) en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de 18-A-S (0-400 μM). Se estimó la actividad a partir de la radiactividad de la banda en un SDS-PAGE (parte superior). El gráfico muestra un experimento representativo. Las barras de error corresponden a duplicados. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,01$) con respecto al experimento control (sin 18-A-S).

IV.2.5. Efecto dual de la subunidad R de *M. circinelloides*

Esta parte del trabajo se realizó con la colaboración de Josefina Ocampo, estudiante de doctorado del laboratorio. De acuerdo a los resultados expuestos, si los péptidos derivados de la subunidad R reflejan el comportamiento de la proteína entera entonces estamos frente a un comportamiento dual de la subunidad R. Clásicamente la subunidad R es un modulador negativo de la actividad quinasa. No ha sido descripto anteriormente como regulador positivo.

Para evaluar el posible comportamiento dual de la subunidad R sobre la actividad de la PKA se midió la actividad quinasa de las subunidades de *M.circinelloides* C_{Mc} y C_b a concentraciones bajas de subunidad R de *M.circinelloides* (R_{Mc}) (< 0.1 nM) (figura IV.10). Concentraciones superiores inhiben la actividad (Ocampo, J. et al., 2007). La subunidad C_{Mc} fue purificada de la misma manera que la subunidad C_{Mr}. La subunidad R fue sobreexpresada en levaduras, purificada por gradiente de sacarosa disociante y cuantificada con [^{3}H]cAMP (Ocampo, J. et al., 2007).

Se observa una activación tanto de C_{Mc} como de C_b de unas 2,5 veces a concentraciones de subunidad R_{Mc} de alrededor de 0,02 nM. Los resultados reflejan un comportamiento similar al de los péptidos 18-A.

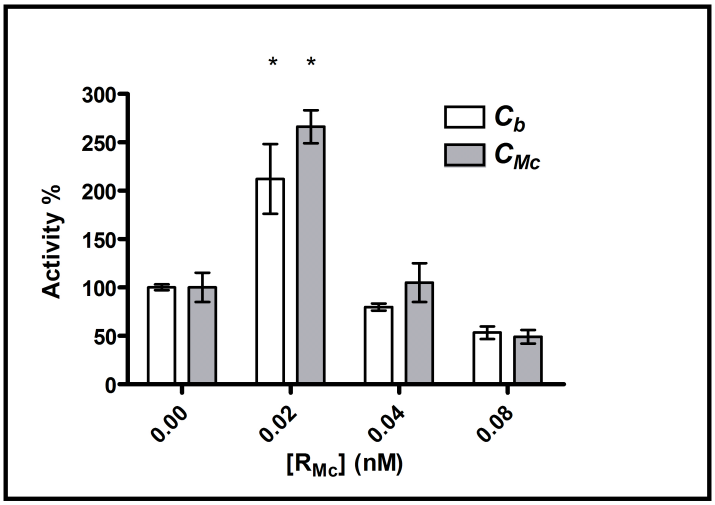


Figura IV.10. (Josefina Ocampo). Efecto de R_{Mc} sobre la fosforilación del kemptido por C_{Mc} y C_b. Se midió la actividad de C_{Mr} (barras grises) y de C_b (barras blancas) a concentraciones saturantes de kemptido (300 μM) en ausencia y en presencia de R_{Mc} (0-0,08 nM). El gráfico muestra un experimento representativo. Las barras de error corresponden a los duplicados. Los asteriscos indican las diferencias significativas ($p < 0,01$) con respecto a los experimentos control (sin R_{Mc}).

Se describe en este trabajo por primera vez el efecto activante de la subunidad R sobre la actividad de la PKA.

IV.3. Discusión y conclusiones

En este capítulo hemos comparado los parámetros cinéticos de estado estacionario de las subunidades C_{Mr}, C_{Sc} y C_b utilizando como sustrato los péptidos derivados de la zona bisagra de R_{Mr} y R_{Sc} (figura IV.4). Los resultados indican que la K_m disminuye y la k_{cat} *relativa* aumenta con la longitud de los péptidos. Si bien se observó el mismo comportamiento para las tres subunidades C, para las subunidades de hongos el efecto de la longitud del péptido en los parámetros cinéticos fue mayor. Estos resultados indican que la región P-4 a P-42 de la subunidad R de C_{Mr} y C_{Sc} participa en la interacción R-C. La región P-4 a P-13 puede ser en parte responsable de las diferencias observadas en la interacción R-C entre especies, teniendo en cuenta la preferencia del péptido 18-S-M sobre el péptido 18-S-S para las dos subunidades C de hongos (figura IV.5). Tanto la región P-13 a P-42 como la superficie interactuante de la subunidad C podría ser responsable en parte también de las diferencias entre especies de acuerdo a los valores que toman las K_{esp} * *relativas* 47/18 de los sistemas homólogos y heterólogos (tabla IV.3).

La variación de los parámetros cinéticos puede ser explicada por el modelo de *clamp*. Experimentos donde se evaluó el efecto de la viscosidad en los parámetros cinéticos de estado estacionario apoyan esta idea (figura IV.6). El modelo propone un acoplamiento termodinámico entre los pasos de unión de los péptidos 18-S y 47-S y de catálisis. Este acoplamiento lleva a un aumento en la tasa de transferencia de fosfato. En la figura IV.11 se ilustra el modelo de *clamp* como un mecanismo de activación en *cis*, en el cual la porción N-terminal del péptido sustrato genera cambios conformacionales en la subunidad C, aumentando la transferencia de fosfato. El hecho de que la K_m del kemptido y del 8-S es más alta para C_{Mr} y C_{Sc} que para C_b, junto con las diferencias observadas en los experimentos de viscosidad pueden estar indicando que el *turnover* de C_{Mr} y de C_{Sc} para péptidos chicos es más bajo que el de C_b. Es probable que el efecto de activación de los péptidos en la actividad de C_b, esté tapado por el *turnover* de la enzima excepcionalmente alto (Lieser, S.A. et al., 2005).

Tanto cuando el sustrato es un péptido (figura IV.7 y 8) como cuando es una proteína (figura IV.9) se observa un aumento en la actividad de la subunidad C a bajas concentraciones de péptido 18-A-M o 18-A-S y una inhibición a altas concentraciones. Una interpretación posible de este resultado es que a altas concentraciones el péptido 18-A compite con el sustrato por el sitio activo impidiendo la fosforilación; mientras que a bajas concentraciones la región del IS del péptido 18-A es desplazada por el sustrato, quedando el extremo N-terminal unido a la subunidad C. Es esta interacción la que genera un aumento en la tasa de transferencia de fosfato, como ocurre con los péptidos fosforilables. Esta vez la activación es en *trans* (figura IV.11).

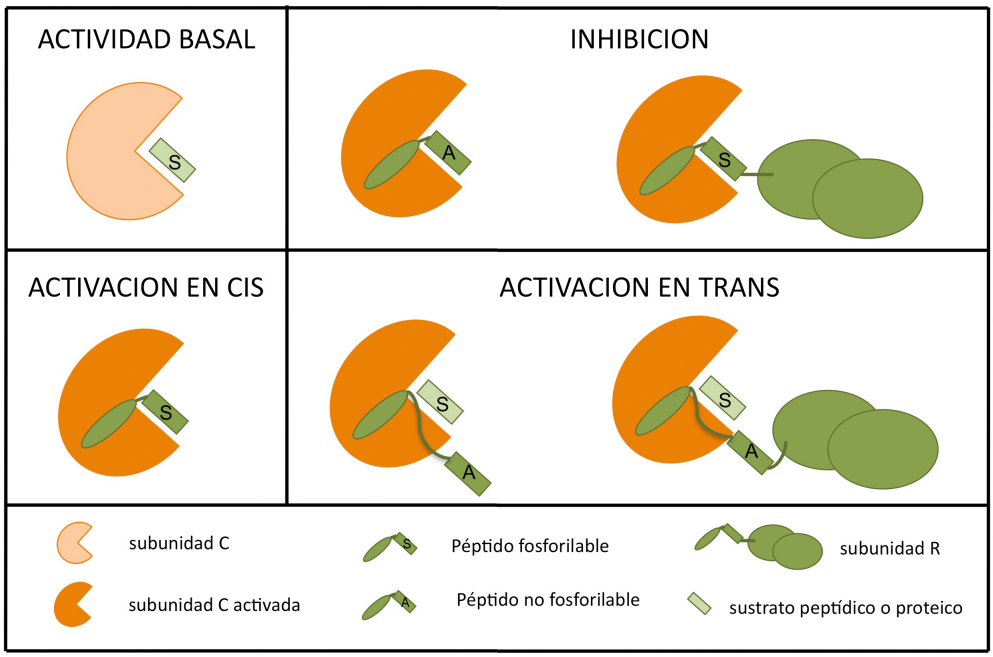


Figura IV.11. Modelo que explica el efecto dual de la subunidad R y los péptidos de ella derivados sobre la actividad de la subunidad C. La disminución de la K_m y el aumento de la k_{cat} de los péptidos 18-S y 47-S se representa como activación en *cis*, producida por la interacción a través de un sitio regulatorio por fuera del sitio catalítico. La subunidad C activada está coloreada con un tono de naranja más fuerte. La inhibición en este modelo está representada por la interacción de los péptidos inhibitorios 18-A o de la subunidad R con la subunidad C. En estas condiciones, la subunidad C está en la conformación activada (naranja fuerte), aunque sin actividad. El efecto *clamp* del extremo N-terminal de los péptidos 18-A o de la subunidad R sobre la fosforilación de sustratos peptídicos o proteicos está representado como activación en *trans*.

Se muestra por primera vez el efecto dual de la subunidad R (figura IV.10): un efecto negativo clásico y un efecto positivo no descripto anteriormente, ilustrado con la subunidad R de *M.circinelloides* agregada a la subunidad homóloga C_{Mc} y C_b.

Una posible interpretación es la siguiente: cuando la concentración de cAMP es baja en la célula o cuando *in vitro* la relación R/C es alta, predomina el efecto inhibitorio. Sin embargo cuando *in vitro* la relación R/C es baja o cuando *in vivo* la interacción R-C es debilitada por el aumento de la concentración de cAMP, es posible que la región del *linker I* estudiada permanezca unida a la subunidad C. Esta interacción, tal como un sitio de anclaje (*docking site*), aumenta la tasa de transferencia de fosfato (activación en *trans*) (figura IV.11).

Existen varios ejemplos de sitios de anclaje en proteínas quinasas y fosfatasas (Remenyi, A. et al., 2006). En muchos casos se ha visto que el anclaje permite que la enzima y el sustrato se encuentren más fácilmente, anclados a un mismo complejo proteico. También se ha reportado que estos sitios de anclaje alteran la conformación de la enzima, regulando alostericamente su actividad. Nuestros resultados apoyan el modelo de regulación alostérica por sitios de anclaje. *In vivo* la holoenzima y los sustratos colocalizan a través de la interacción con proteínas AKAPs.

Nosotros proponemos que en este contexto y en presencia de cAMP, la subunidad R permanence unida a la subunidad C a través de la región del *linker I* y que este sitio de anclaje optimiza la fosforilación de los sustratos en *trans*. Estamos hablando aquí de una holoenzima con actividad, una idea que ha surgido en varias oportunidades en la historia de estudio de la PKA a partir de evidencias indirectas como las presentadas en este capítulo pero que todavía no ha sido comprobada.

CAPITULO V:
DOMINIOS DE UNION A cAMP

V.1. Introducción y objetivos específicos

Como ya se mencionó en el capítulo I, en mamíferos existen dos clases de subunidades regulatorias: I y II. Las de tipo II tienen una Ser en el sitio inhibitorio y por eso son sustrato, mientras que las de tipo I tiene una Ala. Las de tipo I, a diferencias de las de tipo II, requieren ATP-Mg^{2+} para la formación de la holoenzima. Tanto el dominio D/D como los dominios CNB difieren a nivel de secuencia y de estructura.

Se conoce la estructura de los dominios CNB y del dominio D/D de algunas subunidades R de la isoformas RI y RII de mamíferos (tabla V.1), pero no se conoce la estructura de la subunidad R de otros organismos.

Tabla V.1. Estructuras de los dominios D/D y CNB de las subunidades R.

PDB	Descripción	Técnica	Trabajo
1rgs	CBDs I α-cAMP	Rayos X	Su, Y. et al., 1995
1cx4	CBDs II β-cAMP	Rayos X	Diller, T.C. et al., 2001
1ne6	CBDs I α-Sp	Rayos X	Wu, J. et al., 2004 a
1ne4	CBDs I α-Rp	Rayos X	Wu, J. et al., 2004 a
1rl3	CBDs I α	Rayos X	Wu, J. et al., 2004 b
1r2a	D/D II	RMN-17	Newlon, M.G. et al., 1999
2h9r	D/D II α-Pept AKAP 5	RMN-10	Newlon, M.G. et al., 2001
2drn	D/D II α-AKAP	RNM-13	Newlon, M.G. et al., 2001
1l6e	D/D II α	RMN-24	Morikis, D. Et al., 2002
2ezw	D/D I α	RMN-18	Banky, P. et al., 2003
2izy	D/D II α	Rayos X	Gold, M.G. et al., 2006
2izx	D/D II α-AKAP-IS	Rayos X	Gold, M.G. et al., 2006
2hwn	D/D II α-AKAP D2	Rayos X	Kinderman, F.S. et al., 2006
1u7e	Cα-CBD-A I α	Rayos X	Kim, C. et al., 2005
2qvs	Cα-CBDs II α	Rayos X	Wu, J. et al., 2007
2qcs	Cα-CBDs I α	Rayos X	Kim, C. et al., 2007

Las estructuras de los dominios CNB unidos a cAMP de las subunidades RI y de RII muestran que cada uno de los dominios por separado tiene una arquitectura muy parecida. Las diferencias están restringidas a algunos *loops*. La diversidad de isoforma reside en la orientación relativa de los dominios A y B y en la superifice de contacto en ambos dominios (Diller, T. C. et al., 2001).

En las estructuras de los dominios CNB de las subunidades RI y de RII unidos a la subunidad C (Kim, C. et al., 2007; Wu, J. et al., 2007) los dominios A y B están separados, pues la α-hélice quebrada en las estructuras unidas a cAMP (hélices B y C del dominio A y la hélice N del dominio B) es una única hélice larga (figura V.1). A diferencia de lo que ocurre con las estructuras unidas a cAMP, en las estructuras de RI y de RII unidas a la subunidad C la orientación relativa de los dominios A y B es similar.

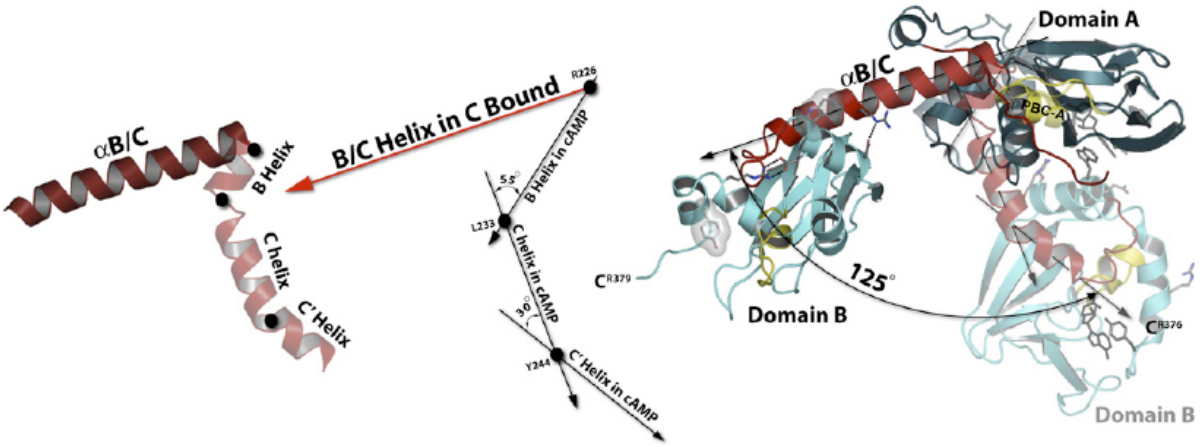


Figura V.1. (Kim, C. et al., 2007). Comparación de la estructura de RIα unida a la subunidad C y a cAMP. A la izquierda se muestra la hélice en su conformación unida a la subunidad C y a cAMP. Hay tres puntos pivot (puntos negros). La hélice C' es la hélice N del dominio B. A la derecha se muestran las estructuras de las dos conformaciones superpuestas por el dominio A. Hélice B/C/N en rojo, dominio A en azul, dominio B en celeste, PBC A y B en amarillo. La subunidad R se muestra como *cartoon*; el cAMP, como *sticks*.

La activación de la PKA es un proceso cooperativo (coeficiente de Hill 1,3-1,5) (Herberg, F.W. et al., 1994). Varias evidencias sugieren que en la holoenzima el cAMP accede primero al sitio B. Esto genera un cambio conformacional que permite la union de otra molécula de cAMP al sitio A. La interacción proteína-ligando permite la liberación de la subunidad C. El dominio A tiene un rol central en la activación de la PKA ya que es titulado alternativamente por el cAMP y la subunidad C (Johnson, D.A. et al., 2001).

Las subunidades R de hongos tienen una Ser en el sitio inhibitorio. Por este motivo en un principio se las consideró de tipo II. Sin embargo comparando las secuencias de los dominios CNB es evidente que las subunidades R de hongos pertenecen a un grupo diferente a RI y a RII (Canaves M.J. & Taylor S.S., 2002).

Como ya se ha mencionado, en *S.cerevisiae* existe una única subunidad regulatoria, Bcy1. Estudios preliminares demuestran que necesita ATP-Mg^{2+} para que se forme la holoenzima.

El objetivo de esta parte de la tesis fue obtener la estructura de Bcy1. *S. cerevisiae* es un modelo muy utilizado para el estudio de transducción de señales. Creemos que tener información estructural de una molécula central en el proceso de internalización de señales, como Bcy1 es un gran aporte para el área. También nos parece que contribuye a entender la evolución de los dominios CNB. Por otro lado nuestro laboratorio ha identificado diferencias interesantes con respecto a las subunidades R de mamíferos en el comportamiento bioquímico de Bcy1 con

análogos de cAMP. Para entender estas diferencias es necesario aunque en muchas ocasiones no suficiente conocer las estructuras de las moléculas comparadas.

La técnica utilizada para la obtención de la estructura de Bcy1 fue cristalografía de rayos X. Este trabajo se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Susan Taylor, de la Universidad de California, San Diego (UCSD). En la primera etapa, la obtención de cristales trabajé con la Dra. Jie Yang. En la segunda etapa, la resolución de la estructura trabajé con el Dr. Jian Wu.

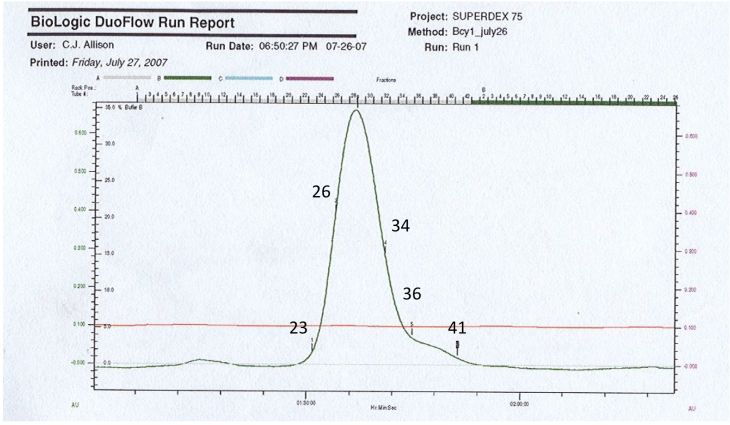
V.2. Resultados

V.2.1. Obtención de proteína purificada

V.2.1.1. Purificación de Δ85Bcy1

Desde 1995, año en que se resolvió la primera estructura de la subunidad R (Δ91RIα) se ha intentado cristalizar la subunidad R entera, sin éxito. Esto muy probablemente esté relacionado con la gran flexibilidad de la molécula. Teniendo en cuenta lo mencionado, nos propusimos cristalizar no la proteína entera sino la mutante de deleción del extremo N-terminal Δ85Bcy1.

La proteína Δ85Bcy1 sobreexpresada en levaduras se purificó por precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ del lisado celular, cromatografía de afinidad por cAMP y filtración en gel en un sistema de FPLC (figura V.2).



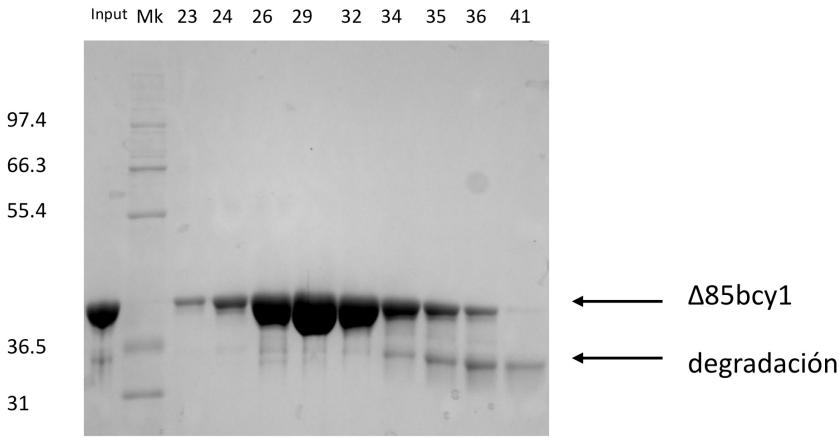


Figura V.2. Purificación de Δ85Bcy1. Filtración en gel Superdex-75 del eluído de la columna de cAMP-sefarosa. En la parte superior se muestra un gráfico de A_{280} en función de número de fracción. Se indica el número de algunas fracciones, cuyas alícuotas fueron sembradas en el gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie blue que se muestra en la parte inferior. El *input*, sembrado en la primera calle es una alícuota de lo que se inyectó en la columna.

En la salida del FPLC se observa un único pico, con un pequeño hombro que corresponde a una banda de menor PM, posiblemente producto de la degradación de la proteína. Se juntaron las fracciones 25 a 32 y se concentró la muestra hasta una concentración de 15 mg/ml. La cantidad de proteína y la pureza de la preparación resultó adecuada para la cristalización.

V.2.1.2. Análisis de los fragmentos de Δ85Bcy1

Se realizaron varios *screenings* para buscar la/s condición/es de cristalización. Luego de dos semanas no se obtuvo ningún cristal. Se observó que tanto en las gotas de cristalización como en la preparación de la proteína guardada a 4ºC habían aparecido bandas de menor PM (figura V.3). Se observaron cuatro bandas mayoritarias que al parecer tienen cierta estabilidad, las cuales fueron analizadas por espectroscopía de masa (Toni Koller, laboratorio de Susan Taylor) y secuenciación del extremo N-terminal (servicio de UCSD) para determinar a qué fragmentos correspondían.

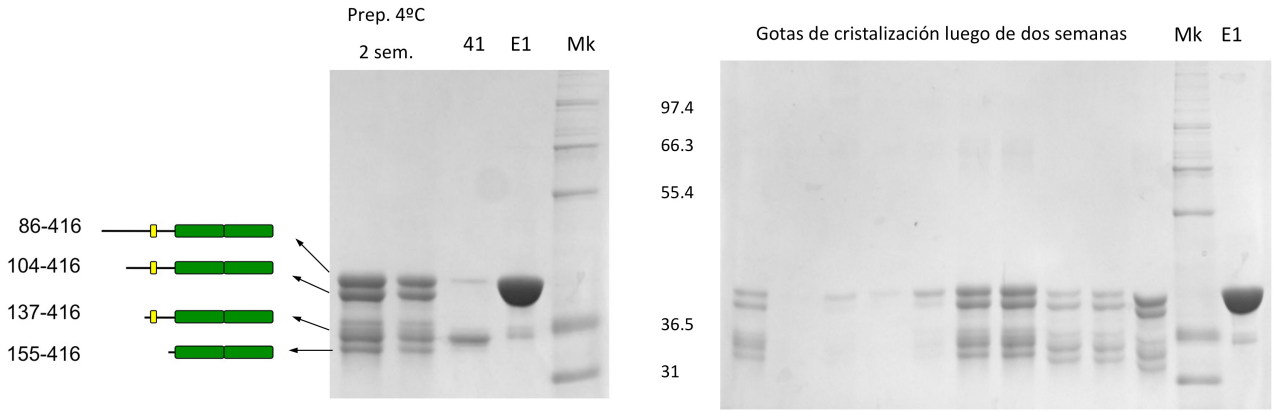


Figura V.3. Análisis por SDS-PAGE teñido con Coomassie blue de la preparación de proteína presente en las gotas de cristalización (gel de la derecha) y en una alícuota de la preparación guardada a 4ºC (dos primeras calles del gel de la izquierda) luego de dos semanas. E1: Eluído 1 de la resina de cAMP. 41: idem figura V.2. Sobre la izquierda están esquematizados los fragmentos identificados por MS correspondientes a las bandas indicadas por las fechas.

El análisis de espectroscopía de masa indicó que las bandas corresponden a la construcción entera (86-416) y a los fragmentos 104-416, 137-416 y 155-416. La secuenciación de los extremos N-terminal de estas cuatro bandas confirmó los resultados de espectroscopía de masa. En la tercera banda además del fragmento del extremo N-terminal 137, se identificaron los extremos 147 y 150.

Las subunidades R de mamíferos presentan los mismos problemas de inestabilidad. También se clivan en la región de la zona bisagra.

V.2.1.3. Diseño de fragmentos de Bcy1 estable

Teniendo en cuenta que los fragmentos identificados tienen cierta estabilidad se diseñaron seis construcciones (figura V.4). Todas son mutantes de deleción del extremo N-terminal y empiezan en en el residuo 137, 139, 141, 150, 155 y 168. Se generaron plásmidos recombinantes de sobreexpresión en bacterias, ya que en este sistema se produce mayor cantidad de proteína recombinante que en levaduras.

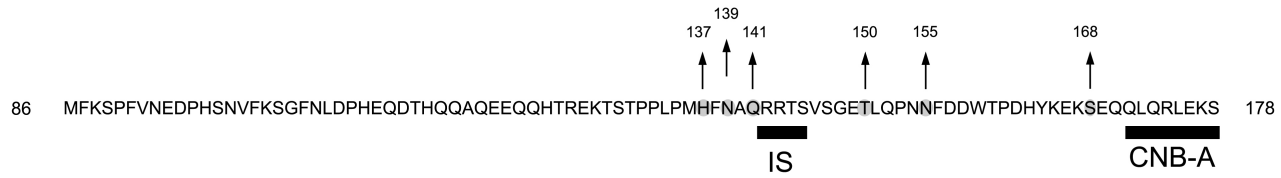
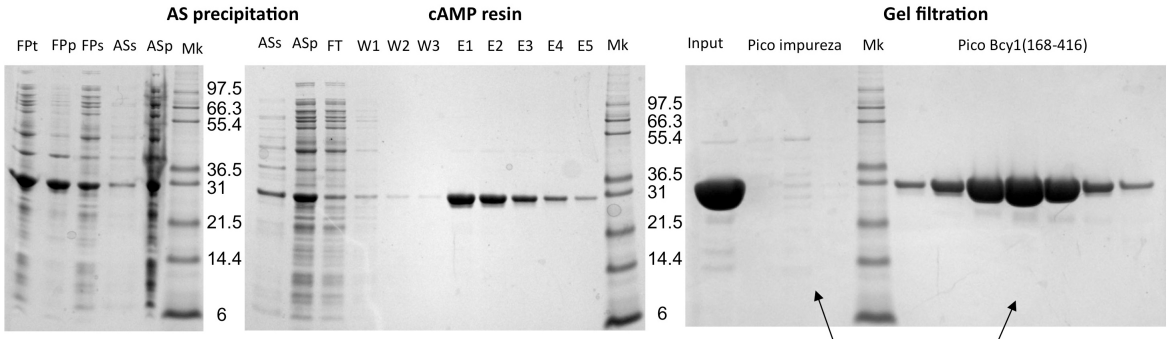


Figura V.4. Secuencia de la zona bisagra de Bcy1. Se indican los estremos N-terminal de las construcciones diseñadas.

Para la obtención de la estructura de Bcy1 unida a cAMP se eligió la contrucción Bcy1(168-416). El resto de las construcciones serán utilizadas en una segunda etapa para la caraterización bioquímica y estructural de las holoenzimas de *S.cerevisiae* (Tpk1/2/3-Bcy1). La construcción Bcy1(136-416) fue utilizada en ensayos de inhibición de la subunidad Cα (Yang, J. et al., 2009).

V.2.1.4. Purificación de Bcy1(168-416)

Se purificó la proteína Bcy1(168-416) de la misma manera que se hizo con Δ85Bcy1 (figura V.5). Se obtuvo 1ml de 15 mg/ml de proteína pura.



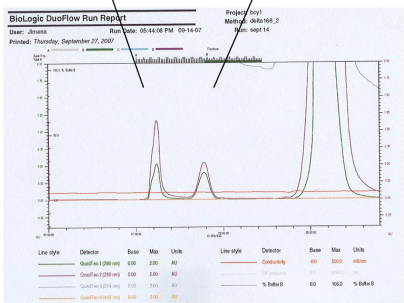


Figura V. 5. Purificación de Bcy1(168-416). SDS-PAGE teñidos con Coomassie blue y perfil de la filtración en gel. FPt: lisado total. FPp: pellet del lisado total (debris celular y células sin romper). FPs: lisado celular propiamente dicho (el contenido celular), con el cual se continuó la purificación. ASs: sobrenadante de la precipitación con sulfato de amonio. ASp: pellet de la precipitación con sulfato de amonio, fracción con la cual se continuó la purificación. FT: percolado de la cromatografía de afinidad (cAMP-sefarosa). W: lavados. E: eluídos. Input: los eluídos concentrados que se inyectaron en la columna de filtración en gel Superdex-75. Mk: marcado de PM.

V.2.2. Cristalización y resolución de estructura

Aunque el buffer que se utilizó en la filtración en gel no contiene cAMP y practicamente todo el cAMP presente en el eluído se separó de la proteína durante este paso de la purificación (pico grande a la derecha en la figura V.5), debido a la gran afinidad de Bcy1 (al igual que el resto de las subunidades R) por el nucleótido (Johnson, K.E. et al., 1987) creemos que el cAMP permanece unido a Bcy1.

La primera etapa de la cristalización consistió en buscar la o las condiciones de cristalización. Este paso se hizo de manera automatizada mediante un robot y con varios kits que contienen muchas condiciones de cristalización diferentes.

Al segundo día aparacieron unos cristales en forma de aguja y de placa (figura V.6.A). Todas las condiciones contenían 25-30 % de PEG 2000- 4000 a pH 8-8,5. Algunas condiciones contenían además sales como $MgCl_2$ y KBr a concentración 0,1-0,2 M. Cada gota contenía muchos cristales de tamaño pequeño (figura V.6.A).

El siguiente paso fue la optimización. El objetivo es obtener menor número de cristales y más grandes. Para ello se exploraron condiciones alrededor de la condición mencionada utilizando diferentes estategias: disminuir la temperatura de incubación, disminuir la concentración de precipitante, agregar algún compuesto, agregar pequeños pedazos de cristales (*microseeding*) y sus combinaciones. En esta etapa el armado de las gotas se realizó de forma manual. Muchas de las nuevas condiciones permitieron la formación de cristales de mayor tamaño. Algunos de ellos eran placas muy delgadas y de gran tamaño -crecimiento rápido- (figura V.6.B), mientras que otros eran más pequeños y de mayor espesor –crecimiento lento- (figura.V.6.C). En general los cristales de grupo B aparecían al segundo día, mientras que los del grupo C aparecieron luego del primer mes. Estos últimos permitieron resolver la estructura.

Los cristales pertenecían al grupo espacial C2 (tabla V.2). La resolución máxima lograda fue de 2,2 Å. La estructura se resolvió por el método de reemplazo molecular utilizando como modelo de partida las coordenadas del subdominio β del CNB-A de la Δ(1-91)RIα (PDB_ID:1RGS). El contenido de solvente fue de 47,4 % con una molécula por unidad asimétrica. La estructura fue refinada a R = 0,200 y R_{free} = 0,263 con buenos parámetros geométricos (tabla V.2).

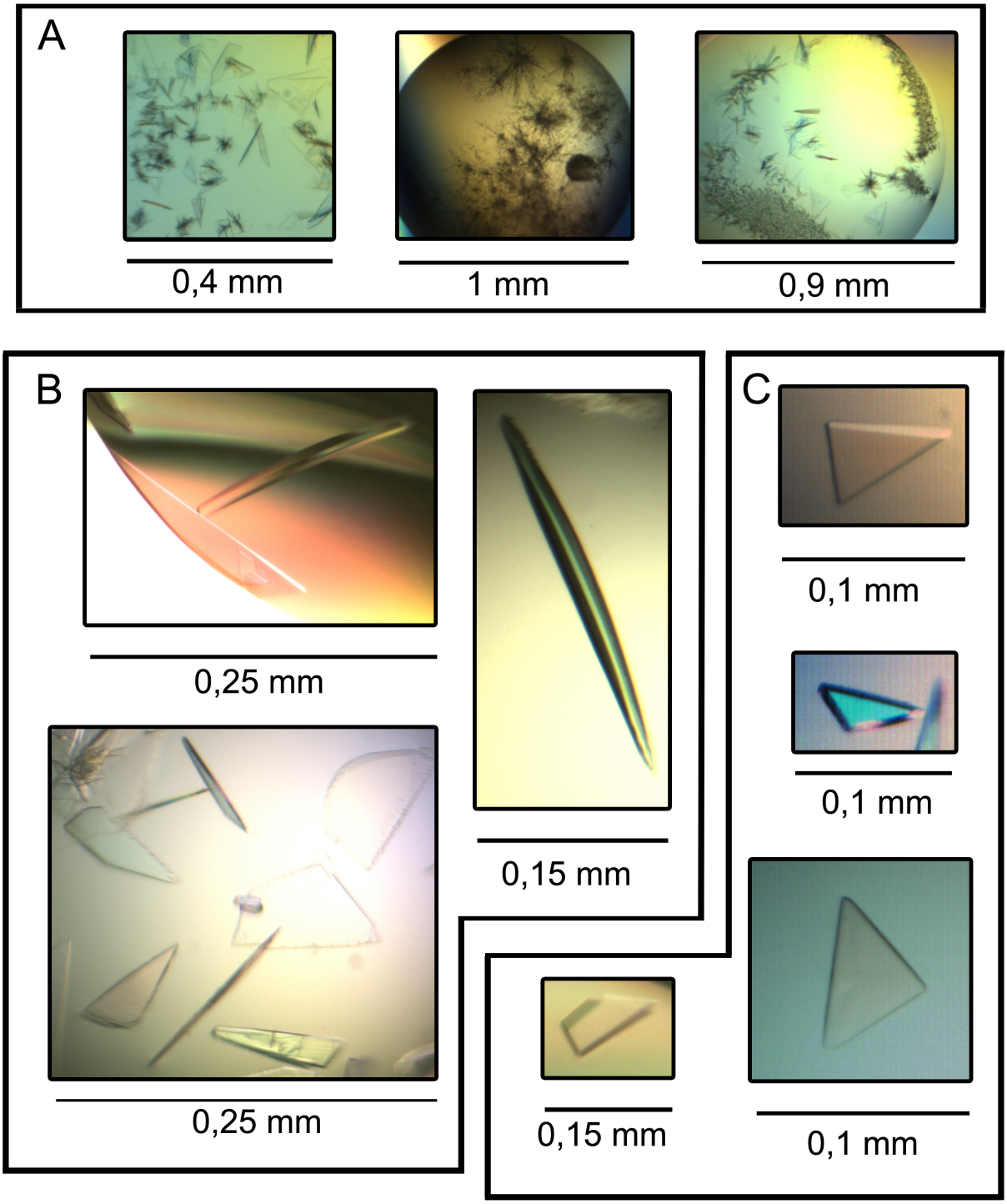


Figura V.6. Fotos de cristales. Grupo A. Cristales iniciales obtenidos en la etapa de *screening*. Gran número de pequeños cristales en forma de placa y aguja. Grupo B. Cristales de gran tamaño. Son placas delgadas. Grupo C. Cristales más pequeños de mayor espesor, de crecimiento más lento y ordenado.

Tabla V.2. Resolución de la estructura.

Cristalización	
Condición	10-20% PEG 3350, 0.1M Tris-HCl pH 8.0-8.5
Procesamiento de los datos	
Grupo espacial	C2
Dimensiones de la celda	a= 146,425 Å, b= 45,040 Å, y c= 39,103 Å, β= 92,510
Rango de resolución (Å)	50,0-2,2
Resolución de estructura	
Reemplazo molecular	Molde RIα 152-225 (subdominio β de CNB-A)
Refinamiento y validación	
R	0,200
R_{free}	0,263
Residuos en posición más favorable (%)	88,1

V.2.3. Estructura de Bcy1

V.2.3.1. Estructura general

La estructura refinada tiene 246 aminoácidos, 2 moléculas de cAMP y 93 moléculas de solvente. Los cuatro primeros residuos del extremo N-terminal están ausentes en el modelo debido a la falta de densidad electrónica.

La arquitectura general es similar a la de las subunidades R de mamíferos, descripta en el capítulo I. La estructura de Bcy1 contiene los dos dominios CNB en tandem, el dominio A y el dominio B (figuras V.7 y V.8). La topología de cada dominio CNB es similar y consiste en un subdominio α y un subdominio β. El subdominio β está compuesto por ocho hojas β y el casete de unión a fosfato (PBC), que es muy conservado y une el cAMP. El subdominio α-helicoidal consiste en el motivo N3A y las hélices B y C; estas regiones están separadas en la secuencia y juntas en la estructura. El motivo N3A consiste en la α-hélice N, un *turn* o *loop* 3_{10} y la α-hélice A. Las superficies que presentan estas α-hélices determinan una comunicación entre los dominios A y B única, diferente a las subunidades RIα y RIIβ (figura V.12), como se comenta más adelante.

Estas características mencionadas son comunes a todas las subunidades R hasta el momento descriptas, incluso muchas de las características son comunes a otros dominios de unión a nucleótido cíclicos. Las regiones de Bcy1 que difieren con las estructuras de mamíferos son las mismas regiones en las que difieren RI y RII (Diller, T.C. et al., 2001), lo cual indica que la variabilidad está restringida a regiones específicas de la molécula.

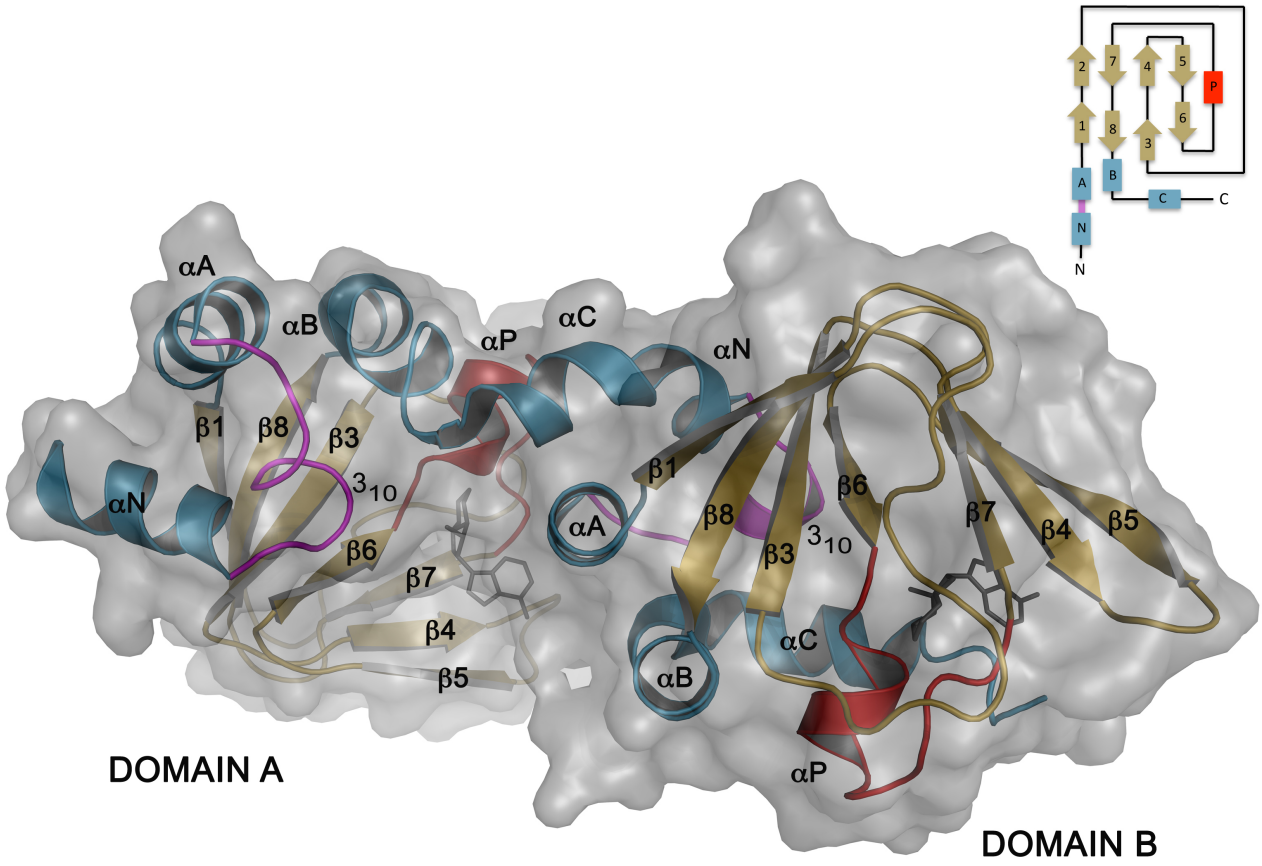


Figura V.7. Estructura general de los dominios CNB de Bcy1. En el ángulo superior derecho se muestra un esquema de guarda griega que corresponde al *core* del dominio CNB. Los colores indican la estructura secundaria. En celeste se indican las α-hélices del subdominio α; en fucsia, el *turn* 3_{10}; en amarillo, las hojas β; en rojo la α-hélice del PBC, en negro, los *turns* o *loops* y en gris las dos moléculas de cAMP. La subunidad R se muestra como *cartoon* y como *superficie* en gris; el cAMP, como *sticks*.

```
                    αN        3₁₀       αA       β1      β2         β3      β4                  β5   β6
bcy1-A     171 --QLQRLEKSIRNNFLFNKLDSDSKRLVINCLEEKSVPKGATIIKQGDQGDYFYVVEKGTVDFYVNDNK-----------VNSSGPGSSF 247
RIalpha-A  121 -KTMAALAKAIEKNVLFSHLDDNERSDIFDAMFPVSFIAGETVIQQGDEGDNFYVIDQGEMDVYVNNEWA-----------TSVGEGGSF 198
RIIbeta-A  137 DDQRNRLQEACKDILLFKNLDPEQMSQVLDAMFEKLVKEGEHVIDQGDDGDNFYVIDRGTFDIYVKCDG-------VGRCVGNYDNRGSF 219
bcy1-B     294 -------DDLLKSMPVLKSLTTYDRAKLADALDTKIYQPGETIIREGDQGENFYLIEYGAVDVSKKG----------QGVINKLKDHDYF 366
RIalpha-B  245 -------EEFLSKVSILESLDKWERLTVADALEPVQFEDGQKIVVQGEPGDEFFIILEGSAAVLQ-----RRSENEEFVEVGRLGPSDYF 322
RIIbeta-B  266 -------ESFIESLPFLKSLEVSERLKVVDVIGTKVYNDGEQIIAQGDSADSFFIVESGEVRITMKRKGKSDIEENGAVEIARCLRGQYF 348

                 αP         β7      β8      αB         αC
bcy1-A     248 GELALMYNSPRAATVVATSDCLLWALDRLTFRKILLGSSFKKRLMY------------------ 293
RIalpha-A  199 GELALIYGTPRAATVKAKTNVKLWGIDRDSYRRILMGSTLRKRKMY------------------ 244
RIIbeta-A  220 GELALMYNTPRAATITATSPGALWGLDRVTFRRIIVKNNAKKRKMY------------------ 265
bcy1-B     367 GEVALLNDLPRQATVTATKRTKVATLGKSGFQRLLGPAVDVLKLNDPTRH-------------- 416
RIalpha-B  323 GEIALLMNRPRAATVVARGPLKCVKLDRPRFERVLGPCSDILKRNIQQYNSFVS---------- 376
RIIbeta-B  349 GELALVTNKPRAASAHAIGTVKCLAMDVQAFERLLGPCMEIMKRNIATYEEQLVALFGTNMDIV 412
```

Figura V.8. Alineamiento de los dominios CNB de Bcy1, de RIα bovina (PDB_ID:1RGS) y de RIIβ de rata (PDB_ID:1CX4). En la parte superior se indica la estructura secundaria resuelta por cristalografía. El patrón de colores es el mismo que el de la figura anterior. La numeración, a izquierda y derecha corresponde a la de cada proteína.

La orientación relativa de los dominios es diferente a RI y a RII (figura VII.9).

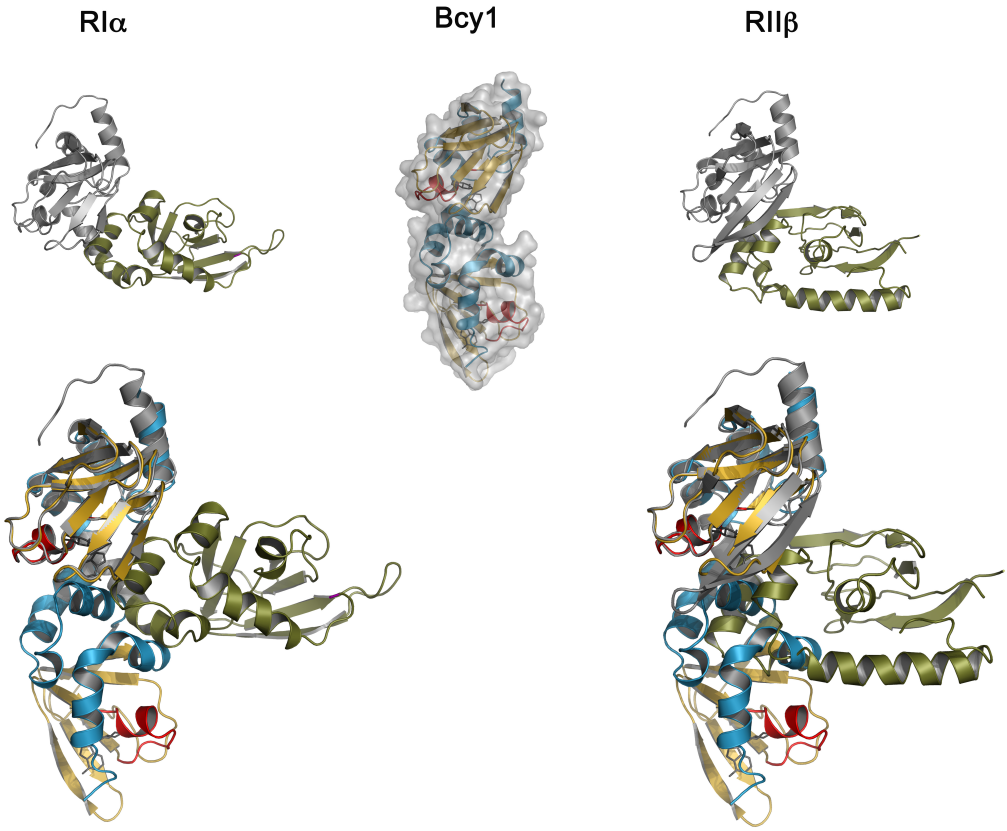


Figura V.9. Estructura de Bcy1 en colores: subdominio α en celeste, subdominio β en amarillo, PBC en rojo y de RIα y RIIβ en gris (dominio A) y verde (dominio B). En la parte superior se muestran cada una de las estructuras. En la parte inferior se muestra la estructura de Bcy1 y de cada una de las subunidades R de mamíferos superpuestas por el dominio A. Las subunidades R se muestran como *cartoon* y en el caso de Bcy1 también como *superficie*; el cAMP, como *sticks*.

V.2.3.2. Dominios CNB

Cada dominio por separado tiene una gran similitud con RIα y RIIβ (figura V.10). El *loop* entre las hojas β 4 y 5 tanto para los dominios A como para los dominios B presentan diferencias. La diferencia principal que genera la orientación diferencial de dominios está en la zona de la curva entre las hélices B y C del dominio A y la hélice N del dominio B (figuras V.10 y V.12). Estas hélices en las subunidades R de mamíferos, se convierten en una hélice única cuando la subunidad R está unida a la subunidad C (V.1). Si bien la secuencia de la curva entre las hélices B y C (curva B-C) no es conservada (figura V.8) tiene la capacidad de formar una α-hélice tanto en RIα como en RIIβ y probablemente también en Bcy1. La zona de la hélice que se curva en Bcy1 está desplazada con respecto a las otras dos. Por el contrario, en el dominio B vemos que las hélices B y C se superponen perfectamente. La secuencia en esta zona es conservada (figura V.8). Acá las diferencias están dadas por el largo de la hélice C y la cola C-terminal. En Bcy1 tanto la hélice C como la cola C-terminal es más corta que en el caso de las otras dos estructuras. De acuerdo al alineamiento (figura II.5) esta característica de la subunidad R de *S.cerevisiae* es común dentro del grupo de los hongos.

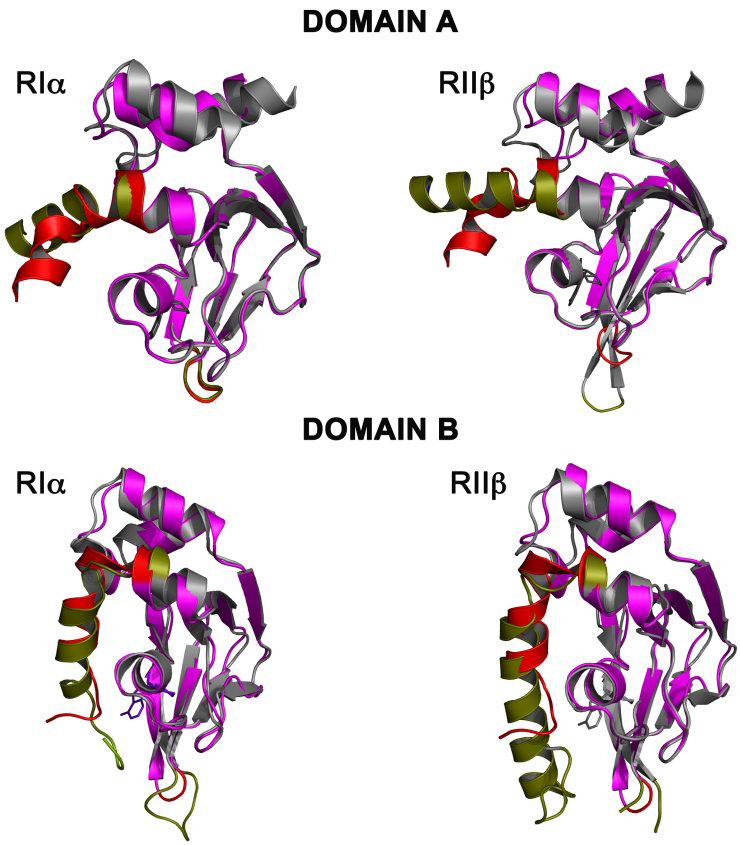


Figura V.10. Dominio A (parte superior) y dominio B (parte inferior) de Bcy1 (fucsia) y RIα o RIIβ (gris) superpuestos. Se destacan con color rojo (Bcy1) y amarillo (las subunidades R de mamíferos) el *loop* β4-β5, las hélices B y C de los dominios A y B y la cola C-terminal. Las subunidades R se muestran como *cartoon*; el cAMP, como *sticks*.

V.2.3.3. El casete de unión a fosfato (PBC)

El PBC (figura V.11), que como se mencionó en el capítulo I es un motivo de 14 aminoácidos está presente en todos los dominios de unión a nucleótidos cíclicos. Está formado por un *loop* y una α-hélice. Tiene tres componentes clave: la Arg que se une al fosfato, el Glu que se une al hidroxilo de la ribosa y un residuo tapa o *capping* que interacciona hidrofóbicamente con el anillo del cAMP. Tanto en el dominio A como en el dominio B de Bcy1 están presentes estos elementos. El residuo *capping* del PBC del dominio A (PBC-A) pertenece al dominio B. En la subunidad RIα es el Trp260 de la hélice A; en cambio en la subunidad RIIβ es la Arg381 de la hélice C (figuras V.11, V.12 y V.15). En Bcy1, al igual que en la subunidad RIα el residuo *capping* pertenece a la hélice A; es la Tyr309. Si bien las cadenas principales tienen una posición diferente e incluso en el caso de RIIβ pertenece a una parte distinta de la molécula, las cadenas laterales del residuo *capping* están en la misma posición, enfrentando a la molécula de cAMP. El residuo *capping* del PBC del dominio B (PBC-B) está en el extremo C-terminal. En Bcy1 es la Pro413. En el extremo C-terminal de las secuencias de las subunidades R de hongos hay una Pro que se conserva, lo cual nos hace pensar que este residuo como residuo *capping* podría ser una característica conservada del grupo de los

hongos. Sin embargo, no se puede descartar que esta función, al menos en algunos hongos la esté cumpliendo una Tyr, que también está conservada en este grupo (figura II.5).

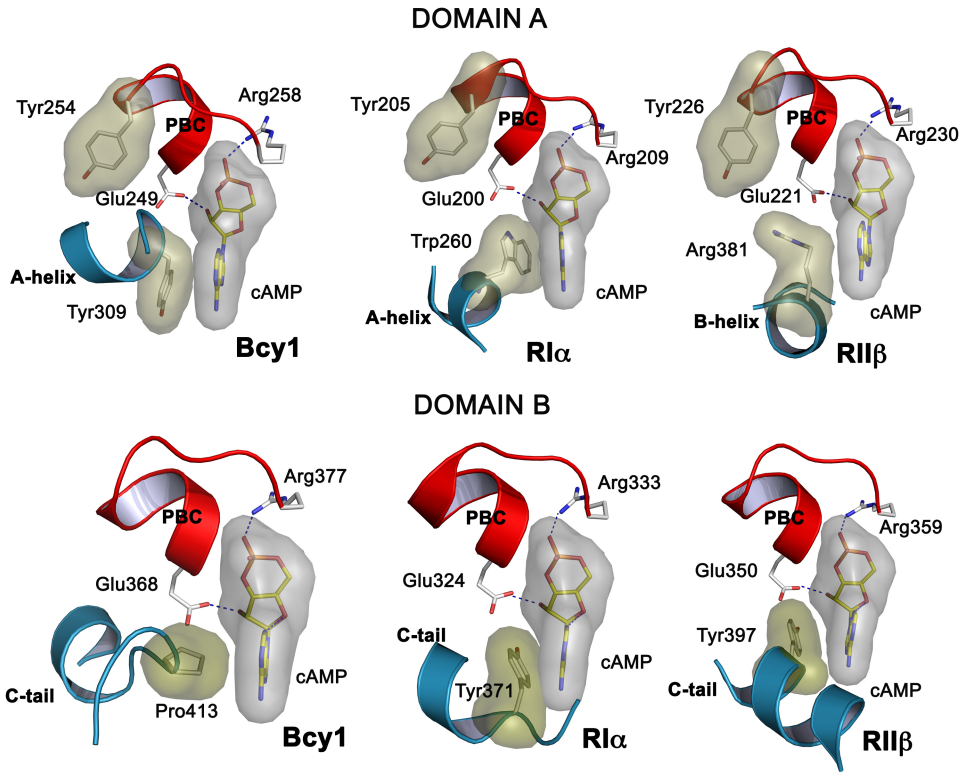


Figura V.11. PBC de Bcy1, RIα y RIIβ del dominio A (parte superior) y del dominio B (parte inferior). El cAMP y una Tyr conservada y los residuos *capping* se representan como *sticks* y como *superficie*. La Arg y el Glu se representan como *sticks*. La coloración indica el tipo de átomo. El PBC (rojo) y la región del subdominio α (celeste) a la cual pertenece el residuo *capping* se representan como *cartoon*.

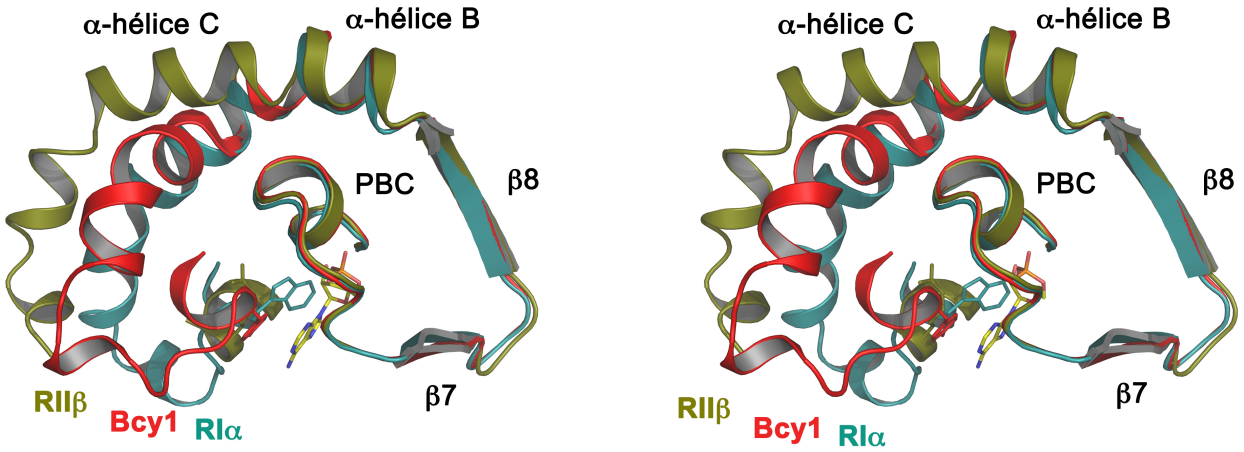


Figura V.12. Comparación de los subdominios α, que unen el dominio A y el B de Bcy1 (rojo), RIα (celeste) y RIIβ (verde). Las estructuras de las subunidades R se representan como *cartoon* y la del cAMP y la del residuo *capping* del PBC-A como *sticks*. Se muestra la región comprendida entre el PBC-A y la hélice A y en el caso de la subunidad RIIβ, una porción de la hélice C.

V.2.3.4. Comunicación entre los dominios A y B

Otro aspecto importante es la superficie de contacto entre los dominios A y B (figura V.13). Su importancia reside en que es la comunicación entre dominios la que determina el comportamiento

cooperativo de la PKA. La superficie de contacto muestra características distintivas. Consiste básicamente en dos regiones: por un lado, la curva B-C y el *loop* 3_{10} y por otro el PBC-A que interactúa con las hélices A y C.

El *loop* 3_{10} y la curva B-C interactúan hidrofóbicamente a través de la Phe183 y la Leu184 del *loop* 3_{10} y la Phe287 de la curva B-C y a través de un puente de hidrógeno de la Lys187 del *loop* 3_{10} y la Ser285 de la curva B-C (panel superior izquierdo de la figura V.13). Ni en RIα, ni en RIIβ estas dos regiones están en contacto. De hecho la Phe183 se conserva en las subunidades R de hongos y en forma exclusiva, de acuerdo al análisis de alineamiento jerárquico del capítulo II (figura II.5 y tabla II.1).

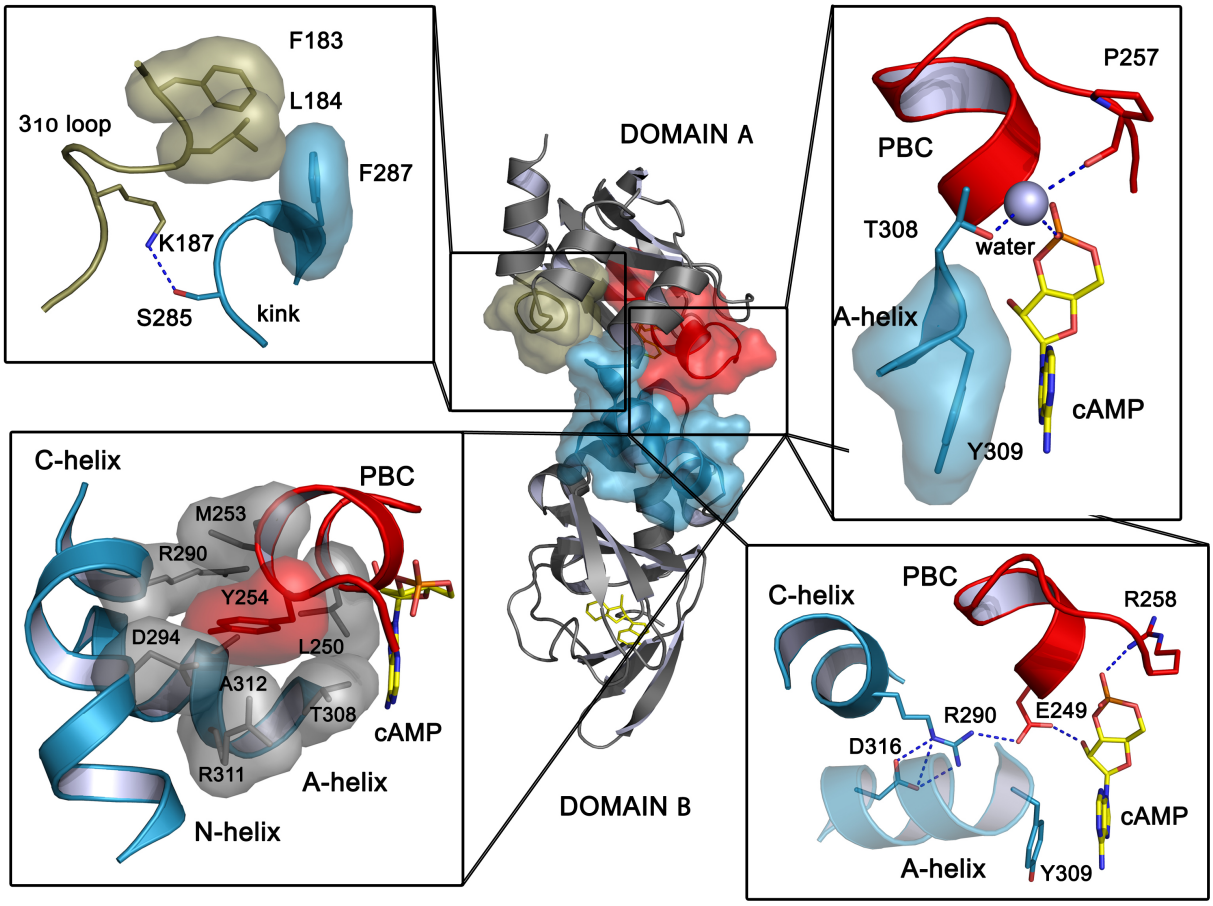


Figura V.13. Superficie de contacto entre los dominios A y B de Bcy1. En el centro se muestra la estructura de Bcy1 como *cartoon* en gris y las moléculas de cAMP como *sticks*. El PBC (rojo) y el *loop* 3_{10} (marrón) del dominio A y el subdominio α que une ambos dominios (celeste) se muestra además como *superficie*. Los residuos que participan en la comunicación entre dominios están representados como *sticks* y en algunos casos también como *superficie*. La coloración de las representaciones en *sticks* corresponde al tipo de átomo. Las líneas punteadas indican puentes de hidrógeno. En los paneles se muestran algunos detalles. En el panel superior izquierdo se muestra la supeficie de contacto entre el *loop* 3_{10} y la curva B-C. En los otros tres paneles se muestra la interacción entre el subdominio α y el PBC-A.

El PBC-A a diferencia del PBC-B es parte de la superficie de contacto entre el dominio A y el dominio B. De acuerdo al mecanismo de activación propuesto por el grupo de Susan Taylor (Kim, C. et al., 2007), la unión del cAMP al PBC-A es necesaria para que la holoenzima se disocie.

En el PBC-A, al igual que sucede con RIα, el Glu conservado (Glu249) forma un puente de hidrógeno con la Arg290 de la hélice C de dominio A y este residuo a su vez se une por puente de hidrógeno al Asp316 de la hélice A del dominio B (panel inferior derecho de la figura V.13 y figuras V.14 y V.15). Las puntas de la cadenas laterales están a una distancia similar; sin embargo, las cadenas principales tienen una posición bien diferente (figura V.15). El par iónico correspondiente en la subunidad RIIβ (Arg262-Asp288) se une por puente de hidrógeno a la Tyr226 (figura V.14).

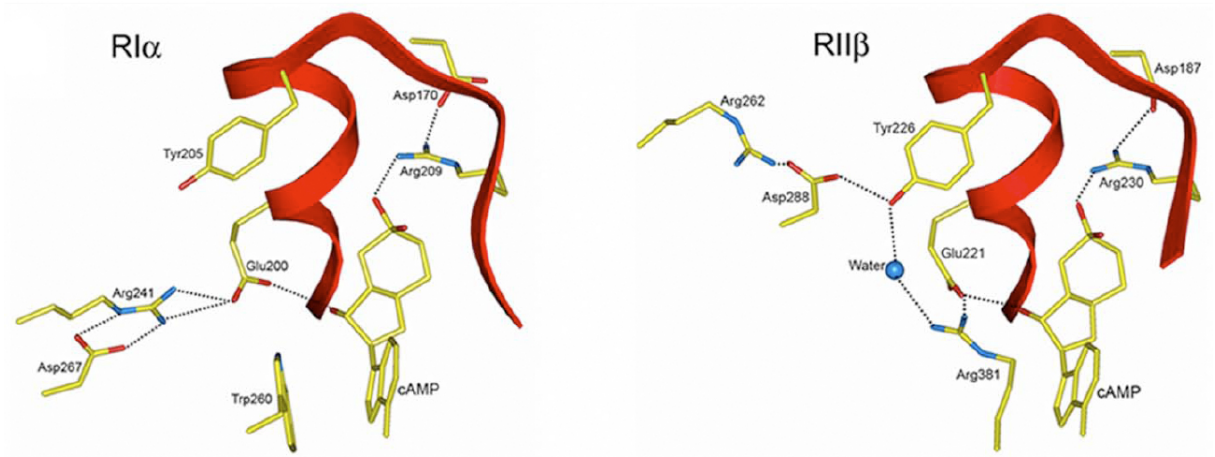


Figura V.14. (Johnson, D.A. et al., 2001) Comunicación entre el dominio A y el dominio B de RIα y RIIβ. El PCB del dominio A se muestra en rojo como *lazo*. Los residuos que participan en la comunicación entre dominios y el cAMP están coloreados por tipo de aminoácido y representados por *sticks*. Una molécula de agua, de color celeste está representada como *pelota*.

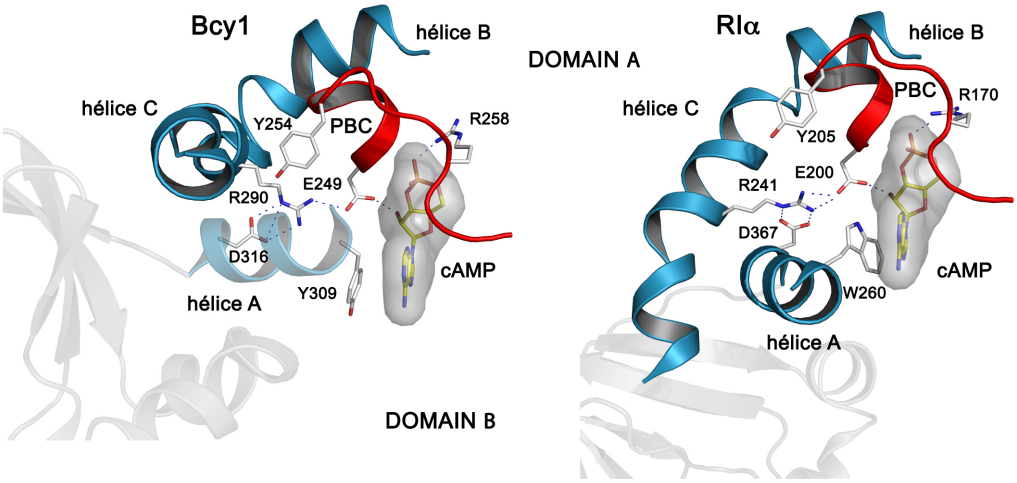


Figura V.15. Estructura de Bcy1 y de la subunidad RIα. Se muestra la estructura de algunas regiones de las subunidades R como *cartoon*: el PBC (rojo) y el subdominio α que une ambos dominios (celeste) y algunos residuos y la molécula de cAMP como *sticks*, los cuales están coloreados de acuerdo al tipo de átomo. Se muestra además la molécula de cAMP como *superficie* en gris.

Hay una molécula de agua estructural que está presente también en las otras dos estructuras, interactuando con el cAMP y con la Pro conservada del PBC-A (Pro257 en Bcy1). En Bcy1 esta molécula de agua estructural también se une a la Thr308 de la hélice A (panel superior derecho de la figura V.13).

La Tyr254 en el PBC-A es altamente conservada (figuras II.5 y V.11). Participa de la interacción con la subunidad catalítica. El entorno de la Tyr es diferente en cada una de las estructuras. En Bcy1 está en un entorno hidrofóbico (panel inferior izquierdo de la figura V.13). En la subunidad RIα la Tyr está expuesta al solvente, mientras que en RIIβ forma puentes de hidrógeno con el Asp288 (figura V.14).

V.2.3.5. Predicción de la interacción de Bcy1 con la subunidad C

Aunque todavía no contamos con la estructura de la holoenzima de levaduras -uno de los próximos objetivos del laboratorio- creemos que al igual que sucede con las subunidades RI y RII, las diferencias observadas en la estructura de Bcy1 unida a cAMP con respecto a las subunidades R de mamíferos desaparecerán en la estructura unida a la subunidad C. Esta predicción está sostenida por la presencia en Bcy1 de residuos identificados como importantes en la interacción R-C de mamíferos (tabla V.3). La excepción a esta regla es la Phe183 y la Lys187 del *loop* 3_{10} del dominio A ya mencionadas. Especial atención merecen las hélices B y C del dominio A. Esta región que sufre grandes cambios conformacionales durante el proceso de activación de la PKA y es una parte importante en la superfcie de contacto con la subunidad C no es conservada. Sin embargo una mirada más detallada revela la conservación de algunos aminoácidos clave (tabla V.3).

Se verificó, asimismo, que los residuos que hacen contacto en la subunidad Cα están presentes en la estructura de Tpk1 (una de las subunidades C de *S.cerevisiae* como se menciona en el capítulo I). La gran mayoría de estos residuos en la superficie de interacción de la subunidad C están conservados en Tpk1, 2 y 3.

Una diferencia en la estructura de Bcy1 en la holoenzima que podemos predecir es la ausencia de un puente salino presente en la estructura de las R de mamíferos clave en el proceso de activación de la PKA (Kim, C. et al., 2007), en el cual intervienen un Glu (261 en RIα) y una Arg (366 en RIα). Estos dos residuos están conservados en hongos (figura II.5). Sin embargo en *S.cerevisiae* la Arg está reemplazada por una Leu, lo cual indicaría que en Bcy1 no existiría el puente salino mencionado.

Tabla V.3. Predicción de la interacción R-C en levaduras.

R (RIα/Bcy1)	C (Cα/TPK1)	Unión	Región en R	
V134 F183	E248 E292	molécula de agua	3_{10} loop	CNB-A
V134 F183	V251 L295	hidrofóbica		
L135 L184	L205 I249	hidrofóbica	3_{10} loop	
L135 L184	Y229 Y273	polar		
H138 K187	K213 K257	molécula de agua	3_{10} loop	
E143 S192	K213 K257	polar	α-hélice N	
E200 E249	I244 M288	hidrofóbica	PBC	
L201 L250	P243 T287	hidrofóbica	PBC	
L204 L252	L198 L242	hidrofóbica	PBC	
Y205 Y254	Y247 Y291	polar	PBC	
Y229 F278	L211, S212 S255, T256	hidrofóbica	α-hélice B	
R230 R279	S212 T256	molécula de agua	α-hélice B	
R230 R279	T197-P T241-P	polar		
L233 L282	K213 K257	hidrofóbica	α-hélice B	
M234 L283	W196 Y240	hidrofóbica	α-hélice B	
T237 S286	K213 K257	hidrofóbica	α-hélice C	
L238 F287	W196 Y240	hidrofóbica	α-hélice C	
R241 R290	W196 Y240	hidrofóbica	α-hélice C	
W260 Y309	K192 P236	hidrofóbica	α-hélice A	CNB-B
D267 D316	R194 V238	polar	α-hélice A	
R352 G396	D276 D320	polar	α-hélice B	
R355 R399	T278 S322	polar	α-hélice B	
V356 L400	K285 Q329	polar	α-hélice B	

En rojo se indican las diferencias entre los dos modelos.

V.3. Conclusiones

En este capítulo mostramos el proceso de obtención de la estructura de los dominios CNB de Bcy1 por cristalografía de rayos X y describimos la estructura, comparándola con las estructuras de las subunidades R ya conocidas.

Al igual que las subunidades R de mamíferos, Bcy1 tiene dos dominios CNB en tandem: A y B (figura V.7), cada uno de ellos con un subdominio α y uno β. En el subdominio β se encuentra el sitio de unión al cAMP, el PBC, cuya secuencia y estructura se encuentra altamente conservada (figura V.11). El residuo *capping* del PBC-A es la Tyr309 y el del PBC-B, la Pro413.

Las regiones de Bcy1 que difieren con las estructuras de mamíferos son las mismas regiones en las que difieren RI y RII (Diller, T.C. et al., 2001), lo cual indica que la variabilidad está restringida a regiones específicas de la molécula. Una de estas regiones es el *loop* β4-β5 de ambos dominios (figura V.10). La otra gran diferencia es el quiebre en las hélices B y C del dominio A (figuras V.10 y V.12).

La orientación relativa de los dominios es diferente a RIα y a RIIβ (figura V.9). Esta orientación diferencial se debe a la diferencias en el quiebre entre las hélices B y C del dominio A y determina zonas de contacto distintas a las observadas en las subunidades R de mamíferos.

La característica más distintiva de Bcy1 es justamente la superficie de contanto entre el dominio A y el B, la cual involucra por un lado la curva B-C y el *loop* 3_{10} y por otro el PBC-A y las hélices A y C (figura V.13).

La estructura de Bcy1 refuerza la observación que se desprendió anteriormente del análisis de secuencia: Bcy1, al igual que otras subunidades R de hongos pertence a un grupo diferente de RI y de RII. Presenta características similares a RIα, como la posición del residuos *capping* y el entrelazado de puentes de hidrógeno del PBC-A (figura V.15); comparte otras características con las subunidades RII, como la Ser fosforilable en el IS y la Met y la Asn conservada del PBC-A (figura V.8) y en otros aspectos es diferente a estos dos grupos, la orientación relativa de los dominios (figura V.9), las interacciones de la Tyr conservada del PBC-A (panel inferior izquierdo de la figura V.13 y figura V.14), la cola C-terminal (figura V.10), entre otros .

De los aminoácidos específicamente conservados en hongos identificados por el alineamiento jerárquico, la Phe183 demostró ser clave en la orientación relativa de los dominios A y B. El rol del resto de los residuos es menos claro.

Todos los residuos nombrados en estas páginas (F183, L184, K187, E249, Y254, P257, R258, S285, F287, R290, T308, Y309, D316 y P416), que determinan la estructura de Bcy1 son residuos conservados, lo cual demuestra una vez más la revelancia de *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental y en particular de Bcy1 como prototipo de subunidad regulatoria.

CAPITULO VI:
CONSIDERACIONES FINALES

En esta tesis nos dedicamos al estudio de la subunidad R de la PKA en hongos. Nuestras preguntas fueron en su mayoría estructurales, es decir nos preguntamos acerca de la estructura cuaternarnia, terciaria y secundaria de dicha proteína. Para contestar estas preguntas hemos utilizado diferentes tipos de técnicas *in vitro* e *in silico*: bioquímicas, de cinética enzimática, bioinformáticas y en el marco de una etapa de incorporación de abordajes estructurales utilizamos cristalografía de rayos X para resolver la estructura de los dominios CNB de Bcy1.

Quizá la razón más importante además de la estética por la cuál es interesante conocer la estructura de una proteína es porque en la gran mayoría de los casos está intimamente ligada a su función.

Acerca del funcionamiento de la PKA en esta tesis hicimos aportes en dos tópicos: por un lado la localización subcelular de Bcy1, a través de la caracterización de su extremo N-terminal y por otro, el mecanismo de activación de la PKA, a través de estudio de la zona bisagra y a través de la resolución de la estructura de los dominios CNB.

La vía de señalización cAMP-PKA juega un rol importante en numerosos procesos celulares como la regulación génica, transporte, crecimiento en todos los organismos eucariotas. La vía es hiperactivada de forma transiente. Mucho del funcionamiento de la PKA, de encendido y apagado inmediato está ligado al control espacio-temporal de la señal vía cAMP, el cual requiere que la PKA esté anclada a dominios subcelulares específicos a través de proteínas AKAPs. En esta tesis se demostró que en *S.cerevisiae* la subunidad R de la PKA dimeriza a través del extremo N-terminal y que esta región, responsable de la localización subcelular de la proteína (Griffioen, G. et al., 2001) es capaz de unirse al AKB de la AKAP dual 2 (figura III.6).

Evidencias bioquímicas (Herberg, F. W. et al., 1996) y estructurales (Kim, C. et al., 2007; Wu, J. et al., 2007) permiten proponer un mecanismo ordenado y secuencial de activación de la holoenzima. El cAMP se une primero al sitio B y luego al sitio A. La identificación de un complejo ternario holoenzima-cAMP en *M.rouxii* formado por la holoenzima y dos moléculas de cAMP unidas al sitio B (Paveto, C. et al., 1989) apoya este modelo. En la holoenzima el PBC-B es más accesible que el PBC-A. Los residuos que interactúan con el cAMP (del sitio A) están sepultados en la estructura de la holoenzima. El reordenamiento de la cola C-terminal rompe un puente salino, que al parecer estabiliza la conformación de la subunidad R unida a C. Esta desestabilización permite por un lado que el sitio B se disocie de la subunidad C y por otro que los residuos que unen el cAMP (del sitio A) estén ahora accesibles. Una vez que la segunda molécula de cAMP se une al sitio A este se disocia de la subunidad C. Todavía no está claro si el IS de la subunidad R se separa del bolsillo catalítico de la subunidad C antes, durante o después de la disociación del dominio A. Una vez libre el sitio catalítico, se produce la activación de la PKA.

Para entender el mecanismo de activación de la PKA se necesita como primer paso conocer el estado inicial (subunidad R unida a subunidad C) y el estado final (subunidad R unida a cAMP). En esta tesis se describió la estructura de esta última conformación de la subunidad R de *S.cerevisiae* (figuras V.7 a V.15). Se identificaron los residuos clave que determinan su estructura y los que se unen a las moléculas de cAMP. Conocer la estructura de Bcy1 unida a cAMP nos permite imaginarnos, predecir cómo será la estructura unida a subunidad C. Una diferencia interesante es la ausencia en Bcy1 del puente salino estabilizador de la conformación unida a la subunidad C. No está claro aún si la ausencia del puente salino implica un mecanismo de activación diferente en *Saccharomyces* y especies emparentadas o si puede ser considerado como un experimento natural que demuestra que dicho puente salino no tiene la relevancia que se le ha adjudicado.

De acuerdo al modelo clásico, la activación de la PKA requiere la disociación completa de la holoenzima. Sin embargo, existen evidencias experimentales que apoyan la idea de una activación sin disociación completa, es decir de una holoenzima con actividad (Yang, S et al., 1995). En esta tesis demostramos que el *linker I* participa en la interacción con la subunidad C en *M.rouxii* y en *S.cerevisiae* (figuras IV.4 y IV.5 y tablas IV.2 y IV.3) y que dicha interacción mejora la *performance* de la enzima (figuras IV.6 a IV.10 y tabla IV.4) Este hallazgo apoya la idea de la holoenzima con actividad.

La subunidad R de la PKA está presente en todos los organismos eucariotas. Los dominios de unión a cAMP están presentes también en bacterias. Al ser la subunidad R una proteína tan ancestral surgen preguntas de evolución molecular. Como ya mencionamos las subunidades R de hongos no pertenecen ni al grupo de las subunidades RI ni al de las subunidades RII, sino que constituyen un grupo separado. Debido a que comparten algunas características con RI y otras con las RII creemos es posible que las isoformas de mamíferos hayan divergido a partir de una subunidad R única más parecida a la de los hongos.

Una de las primeras preguntas que nos hicimos fue si los dominios presentes en las subunidades R de mamíferos estaban presentes en hongos. Los dominios CNB se conservan en todo el grupo. Encontramos que el dominio D/D está presente en todos los hongos, a excepción del *Subfilum* Pezizomycotina del *Filum* Ascomycota. Probablemente la presencia de dominio D/D sea una característica ancentral (plesiomorfía) y se haya perdido en el grupo mencionado aunque no se puede descartar, al menos con nuestro análisis, la hipótesis alternativa de que hayan aparecido más de una vez en la evolución. Más allá de esta reflexión, podemos afirmar que los dominios de D/D no son universales, no están en todas las subunidades R.

El conocimiento que tenemos acerca de la PKA deriva casi exclusivamente de experimentos realizados con unas pocas subunidades R de mamíferos y una única subunidad C, la Cα. Estamos convencidos de la importancia de contar con modelos experimentales alternativos y esperamos haberlos convencido de ello con estas páginas.

Perspectivas

Algunas de las preguntas/tareas que surgieron durante la realización de esta tesis y que quedaron sin responder/realizar son las siguientes:

Dominio D/D

- Resolución del extremo N-terminal de Bcy1 por RMN o cristalografía de rayos X.
- Experimentos del efecto del péptido miristoilado correspondiente al AKB de alguna AKAP sobre la localización subcelular de Bcy1-GFP en *S.cerevisiae*. La disrupción de la localización de Bcy1 por parte del péptido sería una evidencia *in vivo* de la importancia del dominio D/D en el anclaje a proteínas todavía no identificadas.

Zona bisagra

- Análisis de interacción *in vitro* de diferentes regiones de la zona bisagra de Bcy1 o de la subunidad R de *M.rouxii* a Tpk1/2/3 o la subunidad C de *M.rouxii*, por caminado-*array* de péptidos correspondientes a la secuencia de la subunidad R. Este experimento nos permitiría saber qué regiones de la zona bisagra participan en la interacción R-C.
- Predicción de los sitios de unión en Tpk1 de los péptidos utilizados en el capítulo IV por simulación computacional (*docking*). Esto nos permitiría comenzar a incluir la otra cara de la interacción R-C, la subunidad C.
- Anisotropía de fluorescencia para analizar la movilidad y por lo tanto la interacción de diferentes regiones de la zona bisagra en presencia y en ausencia de subunidad C.
- Corroboración de los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la viscosidad sobre los parámetros cinéticos de estado estacionario a través de experimentos de estado pre-estacionario con técnicas de mezclado rápido.

Dominios CNB

- Predicción del sitio de unión de análogos de cAMP en la estructura de Bcy1 por simulación computacional (*docking*). Esto nos permitiría entender el comportamiento bioquímico de Bcy1 observado con distintos análogos de cAMP.
- Resolución de la estructura del complejo Tpk1-Bcy1 por cristalografía de rayos X.

CAPITULO VII:
MATERIALES Y METODOS

VII.1. Materiales

Todos los compuestos químicos son de grado reactivo. Los componentes del medio de cultivo para levaduras son de Laboratorios Difco y de Merck. El anticuerpo policlonal anti-BCY (yN-19) y el anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa son de Santa Cruz Biotechnology Inc.. El anticuerpo policlonal anti-subunidad R de *M.rouxii* fue preparado en conejo (Rossi, S. et al., 1992). El reactivo quimioluminiscente para el revelado de Western-blots y el anticuerpo policlonal anti-GST son de GE Healthcare. El [γ^{32}P]ATP es de Perkin Elmer. El papel de fosfocelulosa (P81) es de Whatman. El anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa, el ATP, el cAMP, la DEAE-celulosa, la fosfocelulosa, la Sephadex G-25, la BSA, la peroxidasa de rabanito, la catalasa de hígado murino, la fosfatasa alcalina de *E.coli* y el citocromo C de corazón bovino son de Sigma Chemical Co. La resina Superdex 75 y la resina de glutatión-sefarosa son de GE Healthcare. La subunidad Cα de *Bos taurus* recombinante y la resina de cAMP-sefarosa fueron cedidas por la Dra. Susan Taylor, de la Universidad de California, San Diego. Las membranas de nitrocelulosa son de MSI. El cocktail de inhibidores de proteasas es de Roche Diagnostics GmbH. Los péptidos fueron sintetizados por GenScript Corporation. Las bacterias *E.coli* de la cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL competentes son de Stratagene. El marcador de peso molecular de proteína es el Mark12 de Invitrogen™. El robot de cristalización es de la compañía Douglas Instruments Ltd. Los *kits* para *screening* y otros *kits* y reactivos utilizados durante la cristalización, los *crioloop* y otras utensillos para el montado de los cristales son de las compañías Hampton Research y Molecular Dimensions Ltd.

VII.2. Herramientas bioinformáticas

VII.2.1. Colección de secuencias por PSI-Blast (*Position-Specific Iterated BLAST*)

El PSI-Blast es un programa iterativo de búsqueda de secuencias a través de la generación de perfiles. A partir de una secuencia inicial el programa busca por Blast secuencias similares, hace un alineamiento múltiple con esas secuencias y genera un perfil, a partir del cual busca más secuencias y así sucesivamente.

Las secuencias secuencias colectadas son las siguientes: Saccharomyces cerevisiae gi|6322156|, Kluyveromyces lactis gi|50308263|, Candida glabrata gi|50290093|, Ashbya gossypii gi|45187774|, Vanderwaltozyma polyspora gi|156841265|, Debaryomyces hansenii gi|50405533|, Pichia guilliermondii gi|190348392|, Lodderomyces elongisporus gi|149248516|, Pichia stipitis gi|150863720|, Yarrowia lipolytica gi|50555167|, Candida albicans gi|68472545|, Pyrenophora tritici gi|189192997|, Mycosphaerella graminicola gi|90200750|, Mucor circinelloides gi|119712284|, Colletotrichum gloeosporioides gi|110293154|, Sclerotinia sclerotiorum gi|156043067|, Colletotrichum lagenarium gi|54036155|, Aspergillus niger gi|145252346|, Coccidioides immitis

gi|119187827|, Magnaporthe grisea gi|39972039|, Neurospora crassa gi|85103516|, Blumeria graminis gi|54036157|, Neosartorya fischeri gi|119491929|, Aspergillus fumigatus gi|70999804|, Podospora anserine gi|171692029|, Gibberella zeae gi|46136785|, Aspergillus nidulans gi|67537634|, Aspergillus clavatus gi|121705476|, Blastocladiella emersonii gi|400120|, Aspergillus oryzae gi|169770467|, Aspergillus terreus gi|115396126|, Schizosaccharomyces pombe gi|238842|, Laccaria bicolor gi|170091082|, Ustilago maydis gi|71024735|, Malassezia globosa gi|164655285|, Coprinopsis cinerea gi|169861339|, Colletotrichum trifolii gi|6225580|, Chaetomium globosum gi|116180120|, Schizophyllum commune gi|78675515|, Mucor rouxii gi|119712286|, Mus musculus I beta gi|125194|, Homo sapiens I beta gi|38257139|, Rattus rattus I beta gi|6016420|, Mus musculus I beta gi|31543509|, Homo sapiens gi|158259951|, Mus musculus gi|74186556|, Homo sapiens I beta gi|1346362|, Homo sapiens 1 beta gi|307377|, Monodelphis domestica gi|126334174|, Homo sapiens I beta isoform CRA_b gi|119607570, Canis familiaris I beta isoform 1 gi|73958240|, Homo sapiens I beta isoform CRA_a gi|119607569|, Bos Taurus I beta gi|115497802|, Bos taurus I alfa gi|115496662|, Canis familiaris I beta isoform 3 gi|73958238|, Sus scrofa I alfa gi|47522874|, Mus musculus I alfa gi|30794476|, Canis familiaris I alfa gi|73965290|, Rattus norvegicus I alfa gi|6981396|, Equus caballus I alfa gi|149723353|, Mus musculus gi|74177287|, Homo sapiens I alfa gi|4506063|, Pongo abelii gi|55726040|, Homo sapiens gi|51476352|, Ornithorhynchus anatinus gi|149635070|, Pongo abelii gi|55733492|, Monodelphis domestica gi|126308822|, Canis familiaris I alfa isoform 3 gi|73965294|, Canis familiaris I alfa isoform 2 gi|73965292|, Mus musculus gi|26350511|, Bos Taurus II beta gi|154426112|, Bos Taurus II beta gi|27807179|, Pan troglodytes II beta gi|114615342|, Homo sapiens II beta gi|47132585|, Canis familiaris II beta isoform 3 gi|73981762|, Homo sapiens II beta gi|49904154|, Homo sapiens II beta gi|400115|, Canis familiaris II beta isoform 10 gi|73981760|, Mus musculus Prkar2b gi|45598396|, Mus musculus II beta isoform CRA_b gi|148704952|, Rattus norvegicus II beta gi|158081759|, Macaca mulatta II beta gi|109067863|, Rattus norvegicus II gi|206671|, Canis familiaris II beta isoform 7 gi|73981752|, Canis familiaris II beta isoform 9 gi|73981756|, Equus caballus II beta gi|194209461|, Monodelphis domestica II beta gi|126340531|, Canis familiaris II beta isoform 8 gi|73981754|, Canis familiaris II beta isoform 4 gi|73981746|, Mus musculus II alfa gi|22550094|, Bos Taurus II alfa gi|145559487|, Mus musculus II alfa gi|125199|, Rattus norvegicus II alfa gi|29789096|, Homo sapiens II alfa gi|4758958|, Homo sapiens gi|158259545|, Canis familiaris II alfa isoform 1 gi|73985624|, Equus caballus II alfa gi|194221340|, Canis familiaris II alfa isoform 7 gi|73985630|, Rattus norvegicus II alfa isoform CRA_a gi|149018505|, Canis familiaris II beta isoform 5 gi|73981748|, Homo sapiens PRKAR2A gi|12803843|, Canis familiaris II alfa isoform 6 gi|73985628|, Canis familiaris II alfa isoform 5 gi|73985626|, Canis familiaris II beta isoform 6 gi|73981750|.

VII. 2.2. Predicción de dominios conservados

Para la predicción de dominios conservados se utilizó el programa SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*). Este programa identifica también zonas de baja complejidad.

VII.2.3. Predicción de estructura secundaria

Se predijo la estructura secundaria de los dominios D/D con el programa PSIPRED.

VII.2.4. Alineamiento multiple de secuencias

Se utilizó el programa MUSCLE (***MU**ltiple **S**equence **C**omparison by **L**og-**E**xpectation*). Se trabajó con los valores de los parámetros predeterminados. Este programa arrojó mejores alineamientos que otros programas de alineamiento múltiple. Los archivos de salida son compatibles con el programa CHAIN.

VII.2.5. Alineamiento jerárquico de secuencias

Para identificar residuos que se conservan específicamente en las subunidades R de hongos usamos un procedimiento estadístico riguroso llamado CHAIN (*Contrast Hierarchical Alignment and Interaction Network*) (Neuwald, A.F., 2007). Este programa reúne información relevante sobre el funcionamiento de las proteínas a través de un análisis estadístico de las secuencias proteicas. Las proteínas divergen funcionalmente por acumulación de mutaciones. Por ello, las similitudes y las diferencias entre dos mecanismos o funciones proteicas pueden evidenciarse a través de las similitudes y las diferencias entre las secuencias. Basado en este principio el programa CHAIN identifica patrones divergentes asociados con grupos de proteínas relacionadas evolutivamente. Cada grupo, sometido a restricciones selectivas diferentes define un estado funcional diferente. El CHAIN identifica aquellos residuos sometidos a las restricciones.

El análisis consiste en un alineamiento de un grupo de secuencias relacionadas, en el cual se forman dos grupos divergentes. Los archivos de entrada (*input*) son (i) el grupo de secuencias de interés y (ii) un grupo más abarcativo que incluye el grupo de interés y otras secuencias adicionales con las cuales se quiere comparar las secuencias de interés.

Luego, el alineamiento es dividido en dos grupos: el grupo principal (*foreground*), que incluye al grupo de interés y el grupo de contraste (*background*) a través de un procedimiento llamado inferencia bayesiana. El grupo principal comparte un patrón conservado que lo distingue del grupo de contraste. Los residuos que conforman el mencionado patrón pueden jugar un rol crítico en el funcionamiento de las proteínas. El alineamiento dividido se denomina alineamiento jerárquico.

Finalmente se genera un archivo de salida (*output*), que muestra en forma gráfica el alineamiento jerárquico y los residuos sometidos a restricción identificados.

VII.2.6. Modelado por homología

Se modelaron por homología los dominios D/D de *S. cerevisiae* y *M.rouxii*. Se utilizó el servidor de Swiss-Model. El molde es la estructura del dominio de D/D de rata unido al dominio AKB de la AKAP D-AKAP2 (2HWN). La salida del modelado incluye el análisis de la calidad de modelo, la cual es determinada a través del programa Verify3D. Este programa evalúa la compatibilidad del modelo atómico (3D) con la secuencia de aminoácidos (1D). El eje *y* en el gráfico representa cuán compatible es cada uno de los residuos de la proteína con la estructura tridimensional modelada. La escala va de 1 (compatible) a -1 (incompatible). En todos los casos este parámetro fue mayor que 0 (figura VII.1).

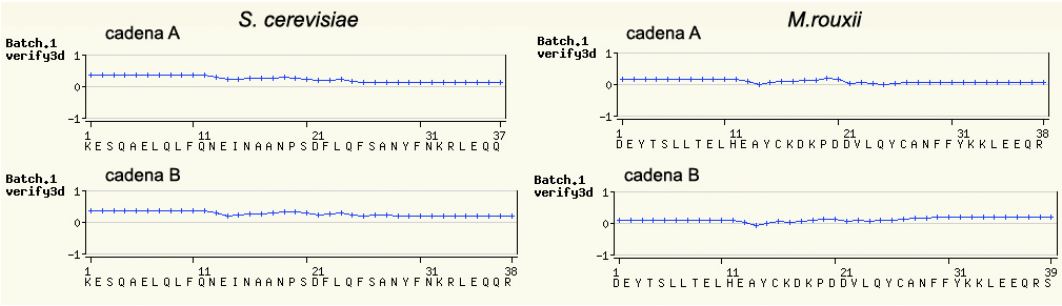


Figura VII.1. Análisis de la calidad de los modelos de los dominios D/D de *S. cerevisiae* y *M. rouxii*. Los gráficos de la parte superior corresponden a la cadena A y los de la parte inferior, a la cadena B.

VII.3. Procedimiento de cristalografía de rayos X

VII.3.1 Cristalización

Para el *screening* se utilizaron cuatro *kits* que contienen cada uno de ellos 96 condiciones diferentes de cristalización: *Crystal Screen HT (HR2-130)*, *Clear Strategy I HT*, *Structure Screen I & II HT* y *Clear Strategy II HT*. El armado de las gotas de cristalización se realizó de manera automatizada con un robot. Se utilizó 0,5 µl de preparación de proteína por gota. El método utilizado fue el de difusión de vapor en gota sentada. Para cada condición se armaron dos gotas, una con 40% y otra con 60% de proteína. La incubación fue a 18ºC. Se miraron las gotas en los días 0, 2, 4, 7, 14, 21 al microscopio óptico.

Para la optimización se utilizó el método de difusión de vapor en disposición gota sentada y gota colgante en placas de 24 *wells*. En esta etapa el armado de las gotas se realizó de forma manual. Se utilizó 1 µl de preparación de proteína por gota en relación 1:1 con la solución de cristalización.

Se exploraron condiciones dentro de los siguientes rangos: 10-25 % PEG 3350 Tris-HCl 0,1 M pH 8 y pH8.5; glicerol (0-15% v/v), MPD (0-12% v/v). Además se probó el agregado de sales y otros aditivos para lo cual se utilizaron los siguientes kits: *PEG/Ion Screen (HR2-126)* y *Additive Screen HT™ (HR2-138)*. Se incubó a las siguientes temperaturas: 21ºC, 10ºC y 4ºC. Otra estrategia utilzada para la optimización fue el microsembrado (*microseeding*), que consiste en agregar a la gota un número reducido de pedazos microscópicos de cristales triturados. El cristal se toma de una gota y se rompe con un pequeño mortero. Luego se realizan diluciones seriadas (1:10-1:1.000.000) en la solución de cristalización. Los cristalitos se siembran con un pelo de cola de caballo. Se moja el pelo en las soluciones y se lo pasa por el medio de la nueva gota de cristalización. Se miraron las gotas en los días 0, 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35 y luego de 4 meses al microscopio óptico.

VII.3.2. Montado de cristales

La colección de datos se realizó en condiciones criogénicas. La solución crioprotectora contenía la solución del *well* correspondiente y glicerol 20 % (v/v).

VII.3.3. Colección de datos

Para evaluar la calidad de los cristales se utilizó un equipo generador de ánodo rotatorio de UCSD. Detector: Mar Research Imaging Plate 345. La prueba consistió en la toma de un *frame* que permitió chequear la calidad de difracción de las muestras y descartar las de baja resolución o las que tenían puntos de difracción distorsionados. Si el *frame* de prueba resultaba satisfactorio, el proceso continuaba tomando un número pequeño de *frames* con separaciones en la rotación de los cristales de 45º ó 90º en el ángulo de giro ϕ. Los datos de los cristales más grandes, a diferencia de los cristales más pequeños, no pudieron ser indexados. Probablemente el crecimiento rápido de los cristales no permitió que el empaquetamiento fuera lo suficientemente ordenado. La colección de datos la realizó Corie Ralston y Banumathi Sankaran en el sincrotrón *Advanced Light Source* de Berkeley, California (línea: 8.2; detector: 3x3 CCD –*charge coupled divide*- ADSC Q315R). Los cristales difractados en el sincrotrón fueron aquellos que tenían patrones de difración de buena calidad y otros cristales obtenidos en las mismas condiciones. La tabla VII.1 presenta los parámetros de colección.

VII.3.4. Procesamiento de datos

Las imágenes fueron procesadas con el programa HKL2000 (Otwinowski, Z. & Minor, W., 1997). El primer paso fue la indexación, que es la asignación para cada reflexión de sus índices de Miller como así también la determinación de los parámetros de la celda unitaria y el grupo espacial del

cristal en estudio. Los cristales pertenecían al grupo espacial C2 (tabla VII.2). La resolución máxima lograda fue de 2,2 Å (tabla VII.2).

Tabla VII.1. Colección de datos.

Colección de los datos	
Sincrotrón	ALS
Línea	8.2
No. de *frames*	200
Oscilación por *frame* (º)	1
Distancia cristal-detector (mm)	320
Tiempo de exposición por *frame* (s)	7.5-7.9
Longitud de onda (Å)	1

Una vez indexados los *sets* de datos finales se procedió a su integración, lo que corresponde a la digitalización de las intensidades medidas para cada reflexión considerando a todos los *frames* individualmente. Los archivos de salida se sometieron a escalado. El mismo tiene la finalidad de ordenar las reflexiones y colocarlas en la misma escala global. También se lleva a cabo el promediado de reflexiones similares medidas más de una vez y el promediado de aquellas reflexiones que por simetría deberían tener igual intensidad, proceso comúnmente denominado en cristalografía como *merge*. Además, el programa detecta ausencias sistemáticas, que son reflexiones que se anulan debido a la simetría cristalina y que permiten inferir acerca del grupo espacial. Es importante agregar que el HKL2000 calcula también un factor de acuerdo de promediado, conocido como R_{sym}, que indica las diferencias porcentuales netas entre las intensidades de reflexión simétricamente idénticas (tabla VII.2). Este estadístico es clave para corroborar la elección correcta del grupo espacial y como criterio de corte en la resolución máxima de un set de datos, descartándose por lo general la información de difracción que presenta un R_{sym} > 0,3.

Se marcó un total de 5% de las reflexiones medidas para fines de validación cruzada (Brunger, A.T., 1992), proceso fundamental para verificar el correcto refinamiento de los modelos, como se indicó en el capítulo I.

Junto con el archivo de salida con los índices de Miller y sus intensidades (*.sca*) se obtiene un archivo con “un informe” (*scale.log*) sobre calidad global de los *sets* de datos mediante un grupo de estadísticos clave (tabla VII.2). Además del R_{sym} nombrado arriba, es muy importante conocer la multiplicidad o redundancia (número de veces que se midió en promedio cada reflexión, mientras más grande mejor), la relación I/σ (señal/ruido, se busca que sea siempre mayor a 1,5-2) y la completitud (porcentaje de reflexiones colectados respecto de los teóricamente posibles de colectar, se procura que sea mayor al 80-90%). Es importante destacar que estos estadísticos se evalúan tanto para la colección global como para la capa de máxima resolución, donde sus valores

son menos satisfactorios en general. Al igual que con el R_{sym}, todo ellos pueden utilizarse como criterio de corte para definir la resolución máxima de un juego de datos.

Tabla VII.2. Procesamiento de datos.

Procesamiento de los datos	
Grupo espacial	C2
Dimensiones de la celda	a= 146,425 Å, b= 45,040 Å, y c= 39,103 Å, β= 92.510
Rango de resolución (Å)	50,0-2,2
R_{sym}	0,058 (0,234)
Completitud de los datos (%)	91,4 (55,5)
Mosaiquismo (*mosaicity*) (º)	0,3
I/σI	23,2 (3,8)
Nro. de refelexiones únicas	12845 (1927)
Redundancia promedio	3,4 (1,9)
No. de moléculas por unidad asimétrica	1
Coeficiente de Matthews	2,34
Volumen solvente (%)	47,38

Los valores entre paréntesis corresponden a la capa de máxima resolución

El número de moléculas presentes en la unidad asimétrica (tabla VII.2) se obtiene a través del cálculo del porcentaje de solvente en el cristal (coeficiente de Matthews, Vm) (Mattheus, B.W., 1968). Por lo general se espera un porcentaje de solvente entre 35 y 65%. En este caso es de 47,38 %.

El mosaiquismo (*mosaicity*) indica el grado del ordenamiento del cristal. Cuanto más ordenado es el cristal menor es el mosaiquismo. Se mide en grados. Un valor de 0,3 (tabla VII.2), es un valor alto. El mosaiquismo de los cristales del grupo B era aún mayor.

Los datos de salida del HKL2000 corresponden a intensidades I (con sus correspondientes errores) para cada reflexión de índices hkl. Sin embargo, para poder continuar con los pasos siguientes del proceso de resolución, es necesario su pasaje a módulos de factores de estructura -módulo de F- en una escala absoluta. El módulo de F al cuadrado es igual a I. Para realizar el cálculo, conocido como reducción de datos, se utilizó el programa *Convert to/modify/extend MTZ* de CCP4.

VII.3.4. Resolución de estructura

La estructura se resolvió por el método de reemplazo molecular utilizando los programas *AMoRe* (Navaza, J., 1994) y *Phaser* (McCoy, A. J. et al., 2007) del paquete CCP4 (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). Los modelos de partida fueron los siguientes (Tabla VII.3): RIα (PDB_ID:1RGS), RIIβ (PDB_ID:1CX4), RIα 121-243 (CNB-A), RIα 152-225 (subdominio β de CNB-A). Los modelos fueron procesados convenientemente antes de ser utilizados en *AMoRe* o *Phaser*. Se removieron las coordenadas de las moléculas de solvente y de cAMP. En los dos

últimos casos en donde el modelo incluía sólo un dominio se buscó una y dos copias del modelo. No se obtuvo solución cuando se usaron como modelos, las estructuras enteras de RI y RII, ni cuando se utilizó el dominio A entero. En cambio, se encontraron dos copias del *core* del dominio A (subdominio β). Como resultado del reemplazo molecular se obtienen las primeras coordenadas (*.pdb*).

Tabla VII.3. Resolución de la estructura.

Reemplazo molecular			
Modelo	Nro de soluciones buscadas	Identidad (%)	Solución
RIα (PDB_ID:1RGS)	1	38,9	No
RIIβ (PDB_ID:1CX4)	1	38,0	No
RIα 121-243 (CNB-A)	1	45,9	No
RIα 121-243 (CNB-A)	2	45,9	No
RIα 152-225 (subdominio β de CNB-A)	1	50,6	Sí
RIα 152-225 (subdominio β de CNB-A)	2	50,6	Sí

V.3.5. Refinamiento

A continuación se describe el procedimiento general utilizado para el refinamiento de la estructura. En primer lugar se sometieron a los archivos de coordenadas de salida de reemplazo molecular a refinamiento de cuerpo rígido mediante el programa *CNS* (Brunger, A.T. et al., 1998).

El siguiente paso consistió en un refinamiento posicional de las coordenadas individuales de cada átomo por medio de templado simulado (*simulating annealing*) en *CNS*.

Luego se calcularon los mapas de densidad electrónica doble y simple diferencia de Fourier ($2F_o$-F_c y F_o-F_c), los cuales fueron visualizados con el programa *FRODO* (A. Roussel, C. Cambillau, Silicon Graphics Inc, Mountain View, CA, 1991) y *Coot* (Emsley, P. & Cowtan, K., 2004) conjuntamente con las coordenadas refinadas (Figura I.36).

Mediante el programa *Coot* se llevó a cabo primeramente la revisación detallada de los mapas de densidad electrónica. En los subdomnios β no se encontraron discrepancias graves entre el modelo y el mapa en cuanto a la cadena principal. La región que une el dominio A y el B y los extremos N y C fueron modelados de forma manual. Una de las primeras observaciones fue la presencia de densidad electrónica no asignada, correspondiente a las moléculas de cAMP que habían sido eliminadas del modelo.

Luego del primer ciclo de modelado manual, se reemplazaron los aminoácidos por los de la secuencia de Bcy1 y se agregaron las moléculas de cAMP y se refinó nuevamente por templado

simulado. Se obtuvieron así nuevos mapas de densidad y coordenadas refinadas, las cuales fueron sometidas nuevamente a modelado manual. Este proceso cíclico se realizó 9 veces.

Uno de los últimos pasos consitió en la inclusión de moléculas de solvente de acuerdo a la densidad observada en los mapas.

En los modelos finales, las cadenas laterales de algunos aminoácidos presentaron una densidad electrónica débil o ausente y por ese motivo fueron modelados como Ala.

Por último, el refinamiento se consideró terminado cuando no se pudieron realizar mejoras sobre los modelos (en base a sus mapas de densidad electrónica) que derivaran en un descenso de los factores R y R_{free}.

V.3.6. Validación

La estructura fue refinada a R = 0,200 y R_{free} = 0,263 con una resolución de 2,2 Å. Se validó la estructura con el programa PROCHECK del paquete CCP4. El gráfico de Ramachandran muestra una buena geometría (figura VII.2 y tabla VII.4) y el valor del factor de temperatura, B si bien es un poco alto está dentro del rango aceptable (tabla VII.4).

Tabla VII.4. Parámetros de validación.

Validación	
R	0,200
R_{free}	0,263
Rango de resolución (Å)	50,0-2,2
Ángulos de Ramachandran más favorables (%)	88,1
Factor B promedio ($Å^2$)	44,6
Factor B σ ($Å^2$)	15,64

Los primeros cuatro residuos en el extremo N-terminal no mostraron densidad electrónica y fueron excluídos del modelo final. El mapa de doble diferencia de Fourier ($2F_o$-F_c) presentó una densidad continua sin interrupciones en la cadena principal. Los siguientes residuos mostraron una densidad electrónica débil o ausente para sus cadenas laterales y por este motivo fueron modelados como Ala: Q171, L172, Q173, R174, R180, K193, R194, L195, V196, I197, N198, L200, E201, K203, S204, V205, K207, Q217, E225, K226 D267, L269, R275, L276, R279, K280, I281, L282, L283, S286, K288 y L291. Todos ellos pertencen al dominio CNB-A.

La estructura todavía no ha sido depositada en el Protein Data Bank.

VII.3.7. Representaciones gráficas de la estrucutras proteicas

Las figuras fueron hechas con PyMOL (*DeLano Scientific*).

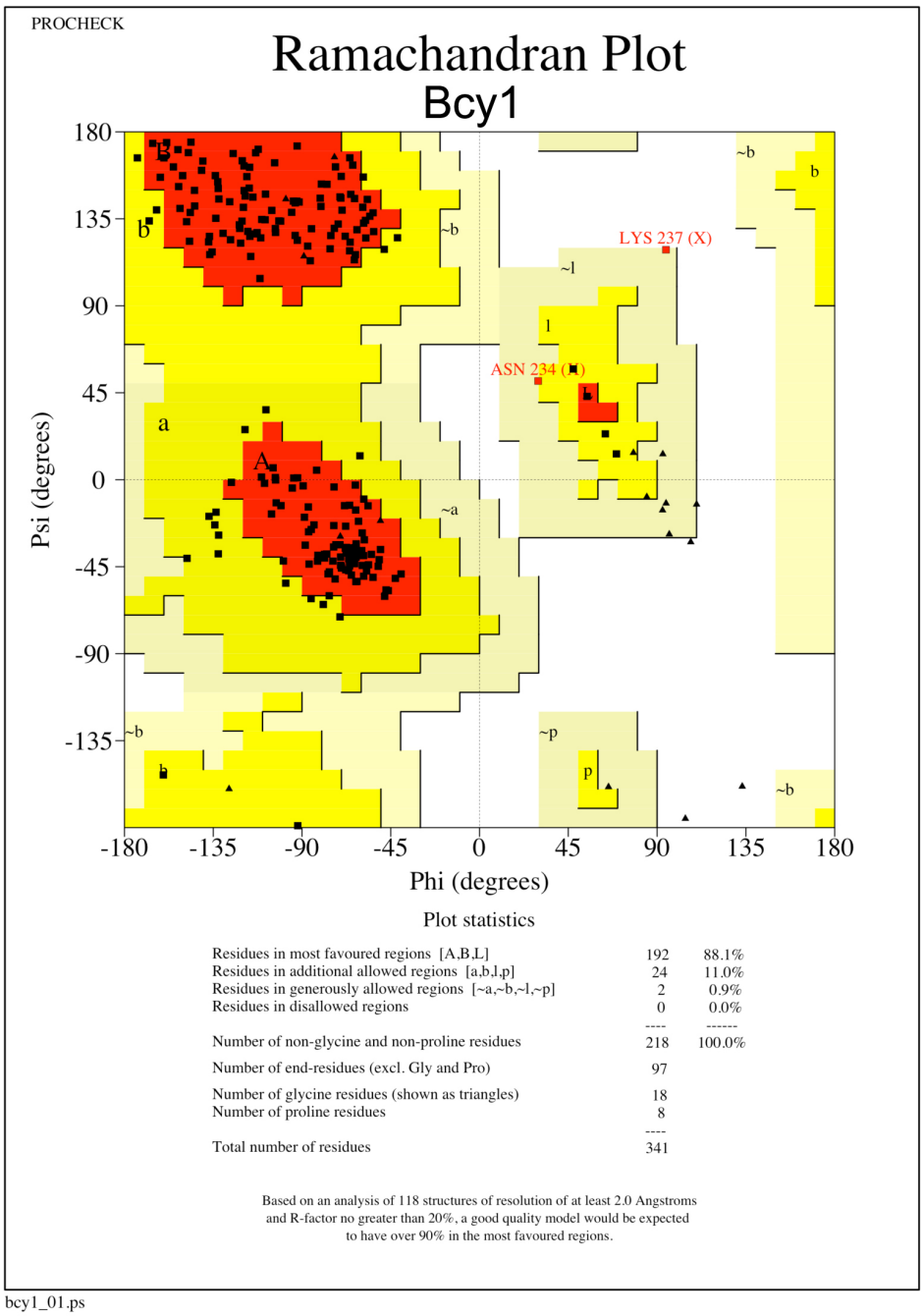


Figura VII.2. Gráfico de Ramachandran de la estructura de los dominios CNB de Bcy1. En la parte inferior se incluye la estadística del gráfico.

VII.4. Cepas

La cepa FGSC 424 *N. crassa* fue cedida por del Dr. Héctor Francisco Terenzi, de la Universidad de Ribeirão Preto, Brasil.

La cepa NRRL 1894 de *M.rouxii* es modelo del laboratorio.

Las cepas de *S.cerevisiae* que se utilizaron son KT1115 (genotipo: MATa leu2 ura3 his3 pep4Δ) y JT20454 (genotipo: MATa his3 leu2 ura3 trp1 tpk1::ade8 tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 msn2::LEU2 msn4::HIS3). La cepa KT1115 carece del gen PEP4, lo cual genera una disminución en la proteólisis general. Fue cedida por el Dr. Kelly Tatchell, Universidad de North Carolina. La cepa JT20454 tiene delecionados los genes TPK1-3 y los genes MSN2 y MSN4. La deleción de los tres genes TPK es letal, a menos que se delecionen también los genes MSN2 y MSN4. Esta cepa fue cedida por el Dr. Johan Thevelein, de la Universidad Católica de Leuven. Se utilizó la cepa KT1115 sin transformar y tranformada con los plásmidos YEp51-BCY1 y YEp51- Δ85BCY1. La construcción de estos plásmidos recombinantes fue realizada en el laboratorio de la Dra. Silvia Moreno por la Dra. Vanina Zaremberg y por la Lic. Fiorella Galello, respectivamente. Son plásmidos de sobreexpresión de la proteína Bcy1 entera y con los primeros 85 aminoácidos delecionado, bajo el promotor GAL10 inducible por galactosa. El marcador de selección es LEU. Se utilizó la cepa JT20454 transformada con el plásmido pPyk101, un plásmido de expresión de la proteína Pyk1 bajo su propio promotor. El marcador de selección es URA. El plásmido fue cedido por el Dr. Thomas Nowak, de la Universidad de Notre Dame.

Se utilizaron bacterias *E.coli* de la cepa DH5α transformadas con los plásmidos pGEX-4T-1 y pGEX-4T-1-D-AKAP2(633-662). El pGEX-4T-1 es un plásmido de sobreexpresión de proteínas fusionadas a GST. Tiene un promotor inducible por IPTG. Estos plásmidos fueron cedidos por la Dra. Susan Tayor, de la Universidad de California, San Diego. Para la sobreexpresión de Bcy1(168-416) se utilizaron bacterias *E.coli* de la cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL competentes. Esta cepa expresa los tRNA de codones poco frecuentes en *E.coli* y la polimerasa T7 bajo un promotor inducible por IPTG.

VII.5. Medios de cultivo

VII.5.1. Medio Mínimo de Nitrato

Para 1 litro de medio

K_2 tartrato.1/2 H_2O	5 g
$NaNO_3$	4 g
KH_2PO_4	1g
$MgSO_4$.7 H_2O	0,5 g
$CaCl_2$	0,1 g
NaCl	0,1 g
Solución de biotina	0,1 ml
Solución de elementos traza	0,1 ml
Sacarosa	15 g
pH final	5.6

Solución de biotina: 5 mg de biotina en 100 ml de etanol 50% (v/v). Se almacena alicuotada a -20ºC.

Solución de elementos traza: Agregar a 95 ml de H_2O ácido cítrico.1H_2O 5g, $ZnSO_4.7H_2O$ 5 g, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$ 1g, $CuSO_4.5H_2O$ 0,25 g, $MnSO_4.1H_2O$ 0,05 g, H_3BO_3 0,05 g y $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0,05 g. Ajustar el volumen a 100ml. Agregar 1 ml de cloroformo como conservante. Se almacena a temperatura ambiente.

VII.5.2. Medio Vogel N

Contiene 1,5% de sacarosa y mezcla de sales. Ajustar el pH a 5,8.

Mezcla de sales (50x)

Agregar a 750 ml de H_2O los siguientes components en el orden indicado y esperando hasta la completa disolución en cada agregado:

Na_3 citrato.5 H_2O	150 g
KH_2PO_4	250 g
NH_4NO_3	100 g
$MgSO_4.7\ H_2O$	10 g
$CaCl_2.2\ H_2O$	5 g
Solución de biotina	5 ml
Solución de elementos traza	5ml

Ajustar el volumen a 1 litro. Agregar 3 ml de cloroformo como conservante. Se almacena a temperatura ambiente.

VII.5.3. Medio rico para levaduras (YPGlu/YPGal)

Extracto de levaduras	1%
Peptona	2%
Glucosa/Galactosa	2%

VII.5.4. Medio mínimo para levaduras

Yeast nitrogen base
Drop out
Fuente de carbono 2%
Llevar a pH 6,5 con KOH.

VII.5.5. Agar tomate

Parte iguales de pure de tomate y agar 6%.

VII.5.6 Medio rico para *M.rouxii* (YPG)

Extracto de levaduras	0,3%
Peptona	1%
Glucosa	3%

Antes de usar agregar 1 ml H_2SO_4 1N cada 250 ml de cultivo.

VII.5.7. Medio Luria-Bertani (LB)

Peptona	1%
Extracto de levadura	0,5%
NaCl	0,5%

VII.6. Soluciones

VII.6.1. Buffer de lisis A

Tris-HCl pH 7.5	10 mM
EDTA	5 mM
EGTA	2 mM
β-mercaptoetanol	2 mM

Inhibidores de proteasas

VII.6.2. Buffer de lisis B

MES pH6,5	20mM
EDTA	2mM
EGTA	2mM
NaCl	200mM
DTT	5 mM

Inhibidores de proteasas

VII.6.3 Buffer de lisis C

Fosfato de potasio pH 6,0	10 mM
EDTA	0,5 mM
β-mercaptoethanol	5 mM

Inhibidores de proteasas

VII.6.4. Buffer FG

MOPS pH 7,0	50 mM
NaCl	200mM
EDTA	2mM
EGTA	2mM
DTT	5 mM

Inhibidores de proteasas

VII.6.5. PBS (buffer salino de fosfato)

Fosfato de potasio pH 7,2	50 mM
NaCl	150 mM

VII.6.6. Buffer AQ

Tris-HCl pH 7,5	50 mM
[γ^{32}P]ATP	0,1 mM
EGTA	0,1 mM
EDTA	0,1 mM
$MgCl_2$	15 mM
β-mercaptoethanol	10 mM

VII.7. Preparación de esporas

VII.7.1. *N.crassa*

Se parte de un *stock* de esporas a partir de las cuales se crece el hongo en medio sólido. El medio que se utiliza es el Medio Mínimo de Nitrato ya que favorece la esporulación. Se incuba a 30ºC por 2 días en oscuridad y luego a 25ºC en un lugar bien iluminado hasta la esporulación (en general unos 5 días). Las esporas se cosechan agregando H_2O estéril al cultivo, despegando mecánicamente las esporas del micelio con una varilla de vidrio o símil y recogiendo el H_2O con las esporas. Luego se filtra la suspension a través de gasa de algodón para separar los pedazos de micelio. La suspension de esporas es lavada con H_2O estéril por centrifugación y decantación, hasta que el sobrenadante esté limpio. El stock de espora se cuantifica al microscopio óptico con un cámara de Neubauer. Para su almacenamiento las esporas son secada en silica gel y una vez secas guardadas a temperatura ambiente.

VII.7.2. *M.rouxii*

El método de preparación de esporas es el mismo que el utilizado para *N.crassa*. A continuación se mencionan las diferencias. El medio es el Agar tomate, que también favorece la esporulación. La incubación es a 30ºC en oscuridad hasta la esporulación (en general unos 5 días).

VII.8. Clonado de las mutantes de deleción de Bcy1

Se clonaron los fragmentos de DNA que codifican para los polipéptidos derivados de Bcy1 137-416, 139-416, 141-416, 150-416, 155-416 y 167-416 en el plásmido pRSETb por amplificación de los de los mismos por PCR, digestion y ligación. Se utilizaron los sitios de restricción XhoI y NdeI, lo cual permite eliminar el péptido de seis His de la construcción.

VII.9. Condiciones de crecimiento

VII.9.1. *N.crassa*

Se creció el hongo en 100 ml del medio líquido Vogel N, partiendo de $1x10^6$ esporas por ml de medio. Se utilizaron Erlenmeyer de vidrio en los cuales se ocupaba un quinto del volumen, ya que una buena aereación es esencial para el crecimiento de este hongo. Se incubó en agitación a 150 rpm a 28ºC por 16 horas.

VII.9.2. *M.rouxii*

Se creció el hongo en 1 litro del medio líquido YPG, partiendo de $1x10^6$ esporas por ml de medio. Se utilizaron Erlenmeyer de vidrio en los cuales se ocupaba un quinto del volumen, ya que una buena aereación es esencial para el crecimiento de este hongo. Se incubó en agitación a 150 rpm a 28ºC por 16 horas.

VII.9.3. *S.cerevisiae*

Se partió en todos los casos de una ansada bien cargada de cultivo en medio sólido. La temperatura de incubación fue en todos los casos 30ºC. Se incubó con agitación a 150 rpm. La cepa KT1115 sin transformar se creció por 16 hs en medio YPGlu. Las cepas transformadas se crecieron por 24 hs en medio selectivo con glucosa como fuente de carbono y luego 16 hs en un volumen 5 veces mayor de medio rico. En las cepas transformadas con el plásmido Yep51 la fuente de carbono fue galactosa, mientras que en las cepas transformadas con pPyk101 la fuente de carbono fue glucosa. Se utilizaron Erlenmeyer de vidrio en los cuales se ocupaba un quinto del volumen, ya que una buena aereación es esencial para el crecimiento.

Para los gradientes de sacarosa analíticos se utilizaron 100 ml de medio rico. Para la purificación de Bcy1 y Δ85Bcy1 para el *pull-down* se utilizaron 500 ml de medio rico. Para la purificación de Δ85Bcy1 para la cristalización se utilizaron 6 litros de medio rico. Para la preparación de la subunidad C se partió de 1 litro de medio rico.

VII.9.4. *E.coli*

Se partió en todos los casos de una colonia aislada. La temperatura de incubación fue en todos los casos 37ºC y el medio de cultivo fue el medio LB. Se incubó en agitación a 150 rpm. Para el *pull-down* las bacterias fueron crecidas por 16 hs en 2 ml de medio. Luego fueron transferidas a 50 ml de medio fresco e incubadas hasta alcanzar una OD_{600} de 0,6. La inducción consistió en el agregado de IPTG 0,1 mM y en la incubación por 4 hs. a 37ºC en agitación. Para la sobreexpresión de Bcy1(168-416) se incubó por 16 hs 5 ml de medio rico con ampicilina, cloranfenicol. Se inocularon 6 litros, en 6 erlenmeyer de 2 litros conteniendo 1 litro del mismo medio de cultivo cada uno con 100 µl (6x100 µl) del cultivo ON por 6-8 hs hasta llegar a una OD_{600} de 0.6-0.8. Luego se indujo con IPTG 0,5 mM por 4 hs a 24ºC en agitación.

VII.10. Cosecha y ruptura de células

Los micelios de *M.rouxii* y *N.crassa* fueron cosechados y secados por filtración en vacío. Las células fueron lisadas con un mortero en N_2 líquido. Una vez que el micelio adquirió aspecto de polvo se lo dejó calentar hasta aproximadamente 4ºC y se lo incubó a 4ºC durante 20 min en buffer de lisis A con agitación.

Las levaduras fueron cosechadas por centrifugación. La ruptura se realizó con bolitas de vidrio de 0,5 mm de diámetro y vortex en buffer de lisis A, B o C.

Las bacterias se cosecharon por centrifugación. Para el *pull-down*, la ruptura se realizó con bolitas de vidrio y vortex en PBC. Para la preparación de Bcy1 para la cristalización la ruptura se realizó con una prensa en buffer de lisis B.

VII.11. Preparación de proteínas

VII.11.1. Preparación de holoenzima

Se lisaron las células en buffer de lisis A. Las holoenzimas de *N.crassa* y de *S.cerevisiae* se obtuvieron por precipitación con 60% de $(NH_4)_2SO_4$ del lisado (figura VII.3 A y B) . Para la preparación de la holoenzima de *M.rouxii,* el lisado fue sometido a una cromatografía de intercambio aniónico de DEAE-celulosa. El buffer utilizado para la cromatografía fue el buffer de lisis A. Se eluyó con NaCl 0,12M y con NaCl 0,35M (figura VII.3.C) (Moreno, S. & Passeron, S., 1980). La purificación fue monitoreada por ensayo de actividad quinasa y su dependencia por cAMP. En este último panel se encuentra prácticamente toda la actividad quinasa y esta depende de la presencia de cAMP en el ensayo. El panel de NaCl 0,35M fue precipitado con 60% de $(NH_4)_2SO_4$ (figura VII.2.D). Antes de utilizar la preparación fue desalada a través de una columna de Sephadex G-25.

VII.11.2. Preparación de subunidad C

La subunidad C se obtuvo en la mayoría de los casos a partir de la preparación de holoenzima de *M.rouxii* (VII.4.A) y de *S.cerevisiae* (III.1C) por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa disociante (VII.11). Cada gradiente fue cargado con 700 µg de proteína. Se ensayó la actividad quinasa en cada fracción. Se observó un pico de actividad de un S entre 3 y 3,5 correspondiente a la subunidad C. Las fracciones del pico se juntaron. Se verificó la ausencia de subunidad R por Western-blot revelado con anticuerpo anti-R de *M.rouxii* y anticuerpo-anti-C-terminal de Bcy1. Este conjunto de fracciones fue utilizada como fuente de subunidad C.

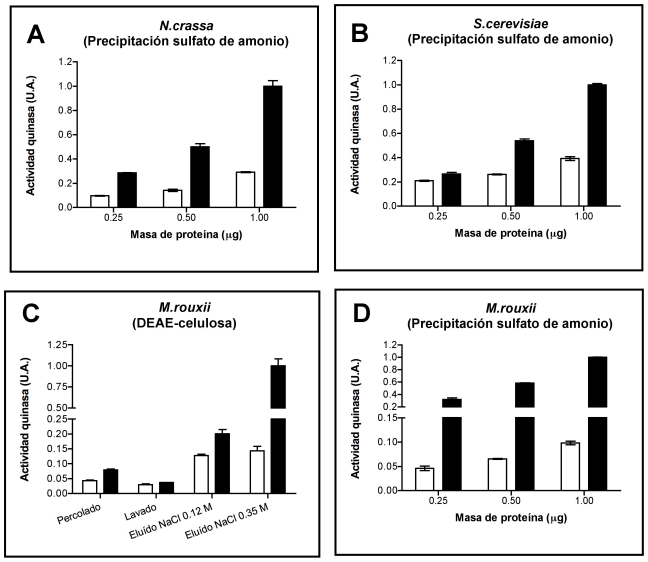


Figura VII.3. Actividad quinasa en ausencia (barras blancas) y en presencia de cAMP 10 μM (barras negras) de las las preparaciones de holoenzima de *N.crassa* (A), *S.cerevisiae* (B) y *M.rouxii* (D) y de la cromatografía de intercambio iónico de DEAE-celuosa de *M.rouxii* (C). El eluído de NaCl 0,35 M se precipitó con sulfato de amonio (D). Se muestra un ensayo representativo. Las barras de error corresponden a los duplicados.

Para los experimentos de viscosidad la subunidad C de *M.rouxii* fue obtenida sometiendo a la preparación de holoenzima a una cromatografía de afinidad por cAMP (cAMP-sefarosa) en buffer de lisis A (figura VII.4.B). La subunidad C queda retenida en la resina y fue lavada con buffer de lisis A y eluída con NaCl 0,5 M. Se ensayó la actividad quinasa en cada fracción. Las fracciones con mayor actividad fueron juntadas y utilizadas como fuente de enzima.

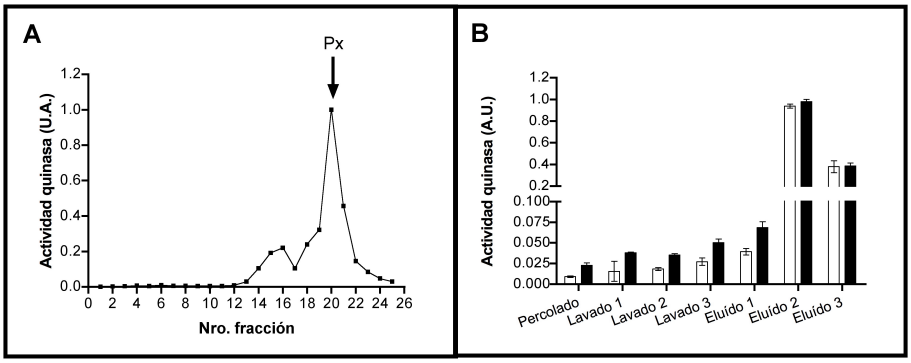


Figura VII.4. Purificación de subunidad C de *M.rouxii* a partir de preparación de holoenzima a través de gradiente de sacarosa disociante (A) y a través de cromatografía de afinidad por cAMP (B). Se muestra un ensayo representativo. Las barras de error corresponden a duplicados.

VII.11.3. Preparación de piruvato quinasa de *S.cerevisiae*

La fuente de Pyk1 fue la cepa JT20454 transformada con el plásmido pPyk101, que permite la expresión de la Pyk1 bajo su propio promotor. La cepa tiene delecionado los tres genes que

codifican para la subunidad C. Se eligió esta cepa para evitar la contaminación de la fuente de sustrato con la enzima. Las células fueron lisadas en buffer de lisis C.

La purificación consistió en dos cromatografías de intercambio iónico, DEAE-celulosa y fosfocelulosa, en buffer de lisis C, seguida de una precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ (Portela, P. et al., 2006). Se recogió el percolado de la cromatografía de DEAE-celulosa y se realizaron dos lavados. El percolado y los lavados fueron sometidos a la cromatografía de fosfocelulosa. Se realizó un lavado y se eluyó con KCl 0,1 M y con KCl 0,3 M. El eluído de KCl 0,3 M contiene la mayor cantidad de Pyk1. Esta fracción se precipitó con $(NH_4)_2SO_4$ 70%. Los precipitados fueron guardados a -20ºC. Previo al ensayo, los pelles fueron resuspendidos y desalados a través de una columna de Sephadex G-25. La purificación fue monitoreada y la preparación cuantificada por SDS-PAGE teñido con Coomassie blue. Se utilizó BSA como estándar.

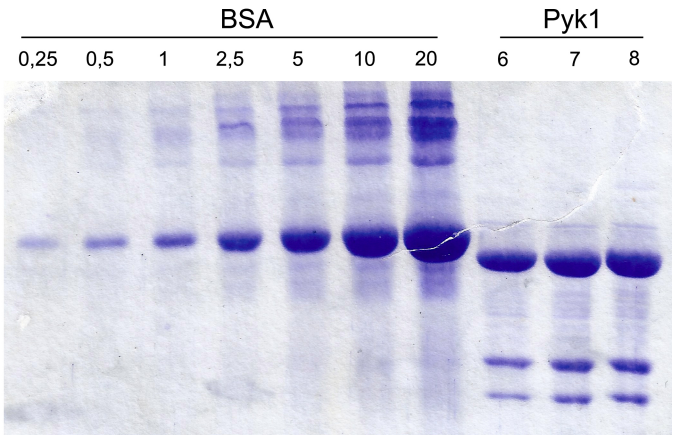


Figura VII.5. Pyk1 purficada. SDS-PAGE teñido con Coomassie blue. Se sembró una curva de BSA (calles 1-7) y tres fracciones del eluído con KCl 0,3 M de la columna de fosfocelulosa.

VII.11.4. Preparación de Bcy1

Para purificación de Bcy1 y sus mutantes de deleción se partió de células que sobreexpresan la proteína recombiante. Bcy1 y Δ85Bcy1 fueron sobreexpresadas en levaduras, mientras que Bcy1(168-416) fue sobreexpresada en bacterias.

Se lisaron las células en buffer de lisis B. La purificación consistió en precipitación con 60% de $(NH_4)_2SO_4$ del lisado, cromatografía de afinidad por cAMP y, para la cristalización, filtración en gel Superdex-75 en buffer FG. La filtración en gel se realizó en un sistema FPLC acoplado a un detector de A_{280}. La cromatografía de afinidad consistió en incubar el precipitado de $(NH_4)_2SO_4$ resuspendido buffer de lisis B con la resina de cAMP-sefarosa a 4ºC por 16 hs. El lavado se hizo con buffer de lavado (buffer de lisis B + NaCl 0,6 M). Se eluyó con buffer de elución (buffer de lisis B + cAMP 40mM pH 5,5). Para la cristalización la preparación se concentró antes de ser inyectada

en la filtración en gel, para reducir el volumen inyectado y como paso final para alcanzar concentraciones entre 10 y 15 mg/ml.

La purificación fue monitoreada por SDS-PAGE teñido con Coomassie blue. La preparación fue cuantificada por Bradford.

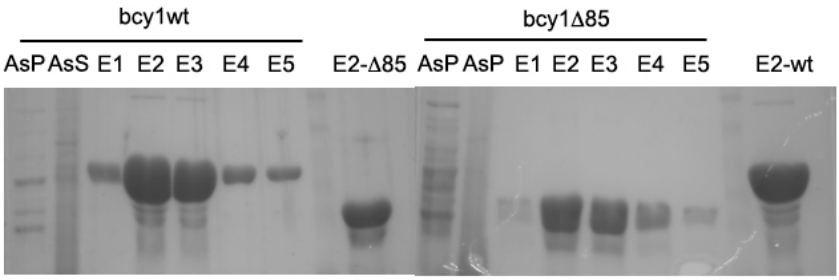


Figura VII.6. Preparaciones de Bcy1 wt y Δ85 utilizadas en el experimento de *pull-down*. SDS-PAGE teñido con Coomassie blue. Las calles corresponden a precipitado y al sobrenadante de sulfato de amonio y a los cinco eluídos de la columna de cAMP-sefarosa.

VII.12. Ensayo de actividad quinasa

Se ensayó de actividad fosfotransferasa de holoenzimas y subunidades catalíticas de *N.crassa*, *S.cerevisiae*, *M.rouxii* y subunidad Cα bovina. Este ensayo se utilizó a lo largo de la tesis con objetivos variados: el seguimiento de una purificación, la identificación de holoenzima o subunidad catalítica en una fracción de gradiente de sedimentación y el estudio de la cinética enzimática de la subunidad C.

La mezcla de reacción contiene buffer AQ (por actividad quinasa) y sustrato proteico o péptídico y otros componentes de acuerdo al caso. En algunos casos la fuente de enzima fue preincubada con todos los componentes a excepción del sustrato proteico o peptídico. La temperatura de reacción fue siempre 30ºC. Los tiempos de incubación variaron en cada caso. La actividad específica del ATP fue 300 cpm/pmol cuando el sustrato era un péptido y 1500 cpm/pmol cuando el sustrato era proteico.

Cuando el sustrato era un péptido la reacción se procesaba por el método del paper de fosfocelulosa (Roskoski, R. 1983).

La incorporación de fosfato en la Pyk1 fue determinado por estimación de cantidad de radiactividad en la banda cortada de un gel SDS-PAGE y cuantificación de la banda en la imagen digitalizada con el equipo Bio-Imaging Analyzer Bas-1800II.

Cuando la finalidad era la identificación de la enzima en un paso de una purificación o en un gradiente de sedimentación el sustrato que se utilizó es el sustrato clásico llamado kemptido. El kemptido es un péptido de siete aminoácidos derivado de la secuencia consenso de la piruvato kinasa de cerdo (Kemp, B.E. et al., 1977).

El tiempo de incubación siempre que la finalidad fuera identificación de actividad enzimática fue de 10 min, tanto para el seguimiento de una purificación como para el análisis de las fracciones de los gradientes de sacarosa.

Los péptidos no-fosforilables fueron incubados con la enzyma en buffer A a 4ºC por 10 min. En este caso la reacción comenzaba con el agregado de kemptido o Pyk1.

VII.13. Otras herramientas

VII.13.1 Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

Los gradientes de sacarosa se utilizaron con fines preparativos, para purificar subunidad C de *M.rouxii* y de *S.cerevisiae* y con fines analíticos, para estimar el coeficiente de sedimentación de las holoenzimas, de las subunidades C y de las subunidades R. En todos los casos el gradiente fue lineal de sacarosa 5-20% (p/v) en buffer de lisis A, con un volumen final de 4,2 ml. Los gradients disociantes incluyen además NaCl 0,5 M y cAMP 1 mM. El volumen de la muestra que se cargaba sobre el gradiente siempre fue de 300µl y la concentración de proteína total fue de entre 300 y 700 µg. Con el fin de calibrar el gradiente para estimar los coeficientes de sedimentación, se incluyeron las siguientes proteínas estándar: catalasa (11,2), fosfatasa alcalina (6,3), peroxidasa (3,5) y citocromo C (1,7). La centrifugación se realizó en una ultracentrífuga Beckmann SW50 a 33.000 rpm for 16 h a 4ºC. Se colectaron en todos los casos 25 fracciones de 180 µl cada una, desde el fondo del tubo hacia la parte superior.

Ensayo de catalasa

Se agregan al gradiente 10 µg de catalasa. El ensayo consiste en mezclar 100 µl de soución A (H_2O_2 0,5% (v/v) en buffer fosfato 50 mM pH 7.0) con 50 µl de fracción, incubar 5 min a 30ºC, frenar la reacción con IK 10% (p/v). El IK es color ambar oscuro en presencia de H_2O_2. En aquella fracciones que tienen catalasa se observa aclaramiento del color. Se determina a ojo la fracción con mayor actividad.

Ensayo de fosfatasa alcalina

Se agregan al gradiente 15 µg de fosfatasa alcalina. El ensayo consiste en mezclar 0,5 ml de paranitrofenilfosfato 0,003M, 1 ml de Tris-HCl 1,5M pH 8.0 y 50 µl de fracción. En pocos minutos se desarrolla un color verde en aquellas fracciones en las cuales está presente la enzima. Se determina a ojo la fracción con mayor actividad.

Ensayo de peroxidasa
Se agregan al gradiente 10 µg de peroxidasa. El ensayo consiste en mezclar 500 µl de solución A (H_2O_2 0,5% (v/v) en Tris-Hcl 10 mM pH 7.0), 10 µl de solución B (punta de espátula de ortodianisidina en 1 ml de metanol) y 10 µl de la fracción. En pocos minutos se desarrolla un color naranja en aquellas fracciones en las cuales está presente la enzima. Se determina a ojo la fracción con mayor actividad.

Ensayo de citocromo C
Esta proteína es de color rojo. Se agregan al gradiente 25 µg de citocromo C. Se determina la fracción con mayor cantidad citocromo C, membrando unos 20 µl en una membrana de nitrocelulosa y obervando a ojo la intensidad del color de la muestra en la membrana.

VII.13.2 Interacción *in vitro* por *pull-down*

El lisado de las bacterias que sobreexpresan GST y GST-AKB fue incubado con 50 µl de resina de glutatión-sefarosa a 4ºC por 16 hs. Luego se lavó con PBS y se incubó con 850 µg de Bcy1 y de Δ85Bcy1 a 4ºC por 2 hs. Luego de lavar la resina con PBS 0,1% Nonidet P-40, 0,2% SDS , las proteínas asociadas son analizadas por Western-blot.

VII.13.3. Dependencia de la viscosidad de los parámetros cinéticos

Se evaluó el efecto de la viscosidad sobre los parámetros cinéticos de estado estacionario. Los experimentos se realizaron a 30ºC en buffer AQ, con el agregado de concentraciones variables de glicerol (0-50% v/v). Las viscosidades de las soluciones de reacción fueron estimadas utilizando un viscosímetro de Ostwald. Se calcularon las viscosidades relativas con respecto a la viscosidad del buffer AQ (η/η_0).

VII.13.4. Estimación de la concentración de proteína total

Se utilizó el método de Bradford o alternativamente SDS-PAGE teñido por Coomassie blue. Se utilizó BSA para realizar la curva de calibración.

VII.13.5 Cuantificación de banda de un gel SDS-PAGE

Se utilizó el programa Image Gauge 3.12, FUJIFILM.

VII. 14. Análisis de los datos

Para los ajustes se utilizó el programa GraphPad Prism 4.02. Las curvas de péptidos sustratos fueron ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten. Se tomaron en cuenta curvas con un R^2 de regresión superior a 0,95. Se compararon las K_m y las k_{cat} *relativas*, (k_{cat} *relativas* = V_{max}t del *péptido* /V_{max} *del kemptido*). La eficiencia catalítica (K_{sp}*) fue calculada como el valor promedio de la k_{cat}

relativa / el valor promedio de la K_m para cada péptido sustrato; la especificidad relativa (K_{sp}* *relativa*), como el cociente entre K_{sp}^* de diferentes péptidos del mismo organismo (47S/8S; 18S/8S; 47S/18S). En los experimentos de viscosidad el cociente de k_{cat} es el cociente de V_{max} obtenida en ausencia de viscógeno con respecto a la V_{max} obtenida en presencia de viscógeno. Los datos de este ensayo (cociente de k_{cat} vs η/η_0)) fueron ajustados a funciones lineales. Se estimaron y compararon las pendientes.

VII.15. Estadística

Cada experimento fue realizado tres veces. En los experimentos del capítulo IV cada punto se ensayó por duplicado. Se utilizó ANOVA de una vía para evaluar el efecto del péptido 18-A-S sobre la fosforilación de la Pyk1 por C_{Sc}, el efecto de 10Nt-M sobre la fosforilación de kemptido por C_{Mr} y el efecto de R_{Mc} sobre la fosforilación de kemptido por C_{Mc}. Se hicieron comparación *post hoc* por Tukey. $\alpha = 0.05$.

Referencias

Adams, J. A. (2001). "Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases." Chem Rev **101**(8): 2271-90.

Adams, J. A. and S. S. Taylor (1993). "Phosphorylation of peptide substrates for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase." J Biol Chem **268**(11): 7747-52.

Banky, P., L. J. Huang, et al. (1998). "Dimerization/docking domain of the type Ialpha regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. Requirements for dimerization and docking are distinct but overlapping." J Biol Chem **273**(52): 35048-55.

Banky, P., M. Roy, et al. (2003). "Related protein-protein interaction modules present drastically different surface topographies despite a conserved helical platform." J Mol Biol **330**(5): 1117-29.

Bartnicki-Garcia, S. and W. J. Nickerson (1962). "Nutrition, growth, and morphogenesis of Mucor rouxii." J Bacteriol **84**: 841-58.

Beebe, S. J., O. Oyen, et al. (1990). "Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase." Mol Endocrinol **4**(3): 465-75.

Berman, H. M., L. F. Ten Eyck, et al. (2005). "The cAMP binding domain: an ancient signaling module." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(1): 45-50.

Brunger, A. T. (1992). "Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures." Nature **355**(6359): 472-5.

Brunger, A. T., P. D. Adams, et al. (1998). "Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination." Acta Cryst. **D54**: 905-921.

Burns-Hamuro, L. L., D. M. Barraclough, et al. (2004). "Identification and functional analysis of dual-specific A kinase-anchoring protein-2." Methods Enzymol **390**: 354-74.

Canaves, J. M. and S. S. Taylor (2002). "Classification and phylogenetic analysis of the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit family." J Mol Evol **54**(1): 17-29.

Cano, C., L. Herrera-Estrella, et al. (1988). "DNA methylation and polyamines in regulation of development of the fungus Mucor rouxii." J Bacteriol **170**(12): 5946-8.

Carr, D. W., R. E. Stofko-Hahn, et al. (1991). "Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif." J Biol Chem **266**(22): 14188-92.

Carr, D. W., R. E. Stofko-Hahn, et al. (1992). "Localization of the cAMP-dependent protein kinase to the postsynaptic densities by A-kinase anchoring proteins. Characterization of AKAP 79." J Biol Chem **267**(24): 16816-23.

Cheng, X., C. Phelps, et al. (2001). "Differential binding of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit isoforms Ialpha and IIbeta to the catalytic subunit." J Biol Chem **276**(6): 4102-8.

Cobb, C. E., A. H. Beth, et al. (1987). "Purification and characterization of an inactive form of cAMP-dependent protein kinase containing bound cAMP." J Biol Chem **262**(34): 16566-74.

Collaborative Computational Project, N. (1994). "The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography." Acta Cryst. **D50**: 760-763.

Cook, P. F., M. E. Neville, Jr., et al. (1982). "Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: kinetic mechanism for the bovine skeletal muscle catalytic subunit." Biochemistry **21**(23): 5794-9.

Copeland, R. A., Ed. (2000). Enzymes: A practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis. New York, John Wiley & Sons, Inc.

de Gunzburg, J., D. Part, et al. (1984). "An Unusual Adenosine 3',5'-Phosphate Dependent Protein Kinase from Dictyostelium discoideum." Biochemistry **23**: 3805-3812.

de Gunzburg, J. and M. Veron (1982). "A cAMP-dependent protein kinase is present in differentiating Dictyostelium discoideum cells." EMBO J **1**(9): 1063-1068.

de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, et al. (1998). "Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP." Nature **396**(6710): 474-7.

Denis, C. L., B. E. Kemp, et al. (1991). "Substrate specificities for yeast and mammalian cAMP-dependent protein kinases are similar but not identical." J Biol Chem **266**(27): 17932-5.

Diller, T. C., Madhusudan, et al. (2001). "Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: crystal structure of the type II beta regulatory subunit." Structure **9**(1): 73-82.

Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Cryst. **D60**: 2126-2132.

Feliciello, A., M. E. Gottesman, et al. (2001). "The biological functions of A-kinase anchor proteins." J Mol Biol **308**(2): 99-114.

Glusker, J. P., Rossi, M. & Lewis, M. (1994). Crystal Structure Analysis for Chemists and Biologists, Wiley, John & Sons, Incorporated.

Gold, M. G., B. Lygren, et al. (2006). "Molecular basis of AKAP specificity for PKA regulatory subunits." Mol Cell **24**(3): 383-95.

Goulding, E. H., J. Ngai, et al. (1992). "Molecular cloning and single-channel properties of the cyclic nucleotide-gated channel from catfish olfactory neurons." Neuron **8**(1): 45-58.

Griffioen, G., P. Anghileri, et al. (2000). "Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in Saccharomyces cerevisiae." J Biol Chem **275**(2): 1449-56.

Griffioen, G., P. Branduardi, et al. (2001). "Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain." Mol Cell Biol **21**(2): 511-23.

Hausken, Z. E., V. M. Coghlan, et al. (1994). "Type II regulatory subunit (RII) of the cAMP-dependent protein kinase interaction with A-kinase anchor proteins requires isoleucines 3 and 5." J Biol Chem **269**(39): 24245-51.

Herberg, F. W., W. R. Dostmann, et al. (1994). "Crosstalk between domains in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase: influence of amino terminus on cAMP binding and holoenzyme formation." Biochemistry **33**(23): 7485-94.

Herberg, F. W., A. Maleszka, et al. (2000). "Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding." J Mol Biol **298**(2): 329-39.

Herberg, F. W., S. S. Taylor, et al. (1996). "Active site mutations define the pathway for the cooperative activation of cAMP-dependent protein kinase." Biochemistry **35**(9): 2934-42.

Hibbett, D. S., M. Binder, et al. (2007). "A higher-level phylogenetic classification of the Fungi." Mycol Res **111**(Pt 5): 509-47.

Huang, G., S. Chen, et al. (2007). "Protein kinase A and casein kinases mediate sequential phosphorylation events in the circadian negative feedback loop." Genes Dev **21**(24): 3283-95.

Huang, L. J., K. Durick, et al. (1997a). "D-AKAP2, a novel protein kinase A anchoring protein with a putative RGS domain." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11184-9.

Huang, L. J., K. Durick, et al. (1997b). "Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits." J Biol Chem **272**(12): 8057-64.

Jarnaess, E., A. Ruppelt, et al. (2008). "Dual specificity A-kinase anchoring proteins (AKAPs) contain an additional binding region that enhances targeting of protein kinase A type I." J Biol Chem **283**(48): 33708-18.

Jarnaess, E. and K. Tasken (2007). "Spatiotemporal control of cAMP signalling processes by anchored signalling complexes." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 931-7.

Johnson, D. A., P. Akamine, et al. (2001). "Dynamics of cAMP-dependent protein kinase." Chem Rev **101**(8): 2243-70.

Johnson, D. A., V. L. Leathers, et al. (1993). "Fluorescence resonance energy transfer within a heterochromatic cAMP-dependent protein kinase holoenzyme under equilibrium conditions: new insights into the conformational changes that result in cAMP-dependent activation." Biochemistry **32**(25): 6402-10.

Johnson, K. E., S. Cameron, et al. (1987). "Expression in Escherichia coli of BCY1, the regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase from Saccharomyces cerevisiae. Purification and characterization." J Biol Chem **262**(18): 8636-42.

Kannan, N., J. Wu, et al. (2007). "Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module." Genome Biol **8**(12): R264.

Kawasaki, H., G. M. Springett, et al. (1998). "A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1." Science **282**(5397): 2275-9.

Kemp, B. E., D. J. Graves, et al. (1977). "Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase." J Biol Chem **252**(14): 4888-94.

Kim, C., C. Y. Cheng, et al. (2007). "PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation." Cell **130**(6): 1032-43.

Kim, C., N. H. Xuong, et al. (2005). "Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA." Science **307**(5710): 690-6.

Kinderman, F. S., C. Kim, et al. (2006). "A dynamic mechanism for AKAP binding to RII isoforms of cAMP-dependent protein kinase." Mol Cell **24**(3): 397-408.

Klein, P. S., T. J. Sun, et al. (1988). "A chemoattractant receptor controls development in Dictyostelium discoideum." Science **241**(4872): 1467-72.

Klinke, S. (2007). Estudio cristalográfico y catalítico de la enzima Lumazina sintetasa en Brucella y otros miembros del orden Rhizobiales. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires. **Doctor:** 161.

Knighton, D. R., J. H. Zheng, et al. (1991a). "Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase." Science **253**(5018): 407-14.

Knighton, D. R., J. H. Zheng, et al. (1991b). "Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase." Science **253**(5018): 414-20.

Kong, C. T. and P. F. Cook (1988). "Isotope partitioning in the adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinase reaction indicates a steady-state random kinetic mechanism." Biochemistry **27**(13): 4795-9.

Kornev, A. P., S. S. Taylor, et al. (2008). "A generalized allosteric mechanism for cis-regulated cyclic nucleotide binding domains." PLoS Comput Biol **4**(4): e1000056.

Kozasa, T. and R. D. Ye (2004). "Selective inhibition of G protein-mediated pathways using RGS domains." Methods Mol Biol **237**: 153-67.

Kuret, J., K. E. Johnson, et al. (1988). "Mutagenesis of the regulatory subunit of yeast cAMP-dependent protein kinase. Isolation of site-directed mutants with altered binding affinity for catalytic subunit." J Biol Chem **263**(19): 9149-54.

Li, F., M. Gangal, et al. (2000). "Consequences of cAMP and catalytic-subunit binding on the flexibility of the A-kinase regulatory subunit." Biochemistry **39**(50): 15626-32.

Li, Y. and C. S. Rubin (1995). "Mutagenesis of the regulatory subunit (RII beta) of cAMP-dependent protein kinase II beta reveals hydrophobic amino acids that are essential for RII beta dimerization and/or anchoring RII beta to the cytoskeleton." J Biol Chem **270**(4): 1935-44.

Lieser, S. A., B. E. Aubol, et al. (2005). "Coupling phosphoryl transfer and substrate interactions in protein kinases." Biochim Biophys Acta **1754**(1-2): 191-9.

Majerfeld, I. H., B. H. Leichtling, et al. (1984). "A cytosolic cyclic AMP-dependent protein kinase in Dictyostelium discoideum. I. Properties." J Biol Chem **259**(1): 654-61.

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

Matthews, B. W. (1968). "Solvent content of protein crystals." J Mol Biol **33**(2): 491-7.

McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, et al. (2007). "Phaser crystallographic software." J. Appl. Cryst. **40**: 658-674.

Moreno, S. and S. Passeron (1980). "Further studies on cyclic adenosine 3':5'-monophosphate protein kinase from dimorphic fungus Mucor rouxii." Arch Biochem Biophys **199**(2): 321-30.

Morikis, D., M. Roy, et al. (2002). "Electrostatic properties of the structure of the docking and dimerization domain of protein kinase A IIalpha." Eur J Biochem **269**(8): 2040-51.

Navaza, J. (1994). "AMoRe: an automated package for molecular replacement." Acta Cryst. **A50**: 157-163.

Neuwald, A. F. (2007). "The CHAIN program: forging evolutionary links to underlying mechanisms." Trends Biochem Sci **32**(11): 487-93.

Newlon, M. G., M. Roy, et al. (2001). "A novel mechanism of PKA anchoring revealed by solution structures of anchoring complexes." EMBO J **20**(7): 1651-62.

Newlon, M. G., M. Roy, et al. (1999). "The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR." Nat Struct Biol **6**(3): 222-7.

Ocampo, J., S. Moreno, et al. (2007). "PKA from Mucor circinelloides: model to study the role of linker I in the interaction between R and C subunits." Biochem Biophys Res Commun **362**(3): 721-6.

Otwinowski, Z. and W. Minor (1997). "Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode." Methods Enzymol. **276**: 307-326.

Pastori, R., S. Moreno, et al. (1985). "Polymeric structure of the cyclic AMP-dependent protein kinase from the dimorphic fungus Mucor rouxii and purification of its catalytic subunit." Mol Cell Biochem **69**(1): 55-66.

Paveto, C., S. Passeron, et al. (1989). "Two different intrachain cAMP sites in the cAMP-dependent protein kinase of the dimorphic fungus Mucor rouxii." Eur J Biochem **179**(2): 429-34.

Pawson, T. and J. D. Scott (1997). "Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins." Science **278**(5346): 2075-80.

Pereyra, E., V. Zaremberg, et al. (1992). "Effect of Dibutyryl-cAMP on Growth and Morphology of Germinating Mucor rouxii Sporangiospores." Experimental Mycology **16**: 93-101.

Portela, P., S. Howell, et al. (2002). "In vivo and in vitro phosphorylation of two isoforms of yeast pyruvate kinase by protein kinase A." J Biol Chem **277**(34): 30477-87.

Portela, P., S. Moreno, et al. (2006). "Characterization of yeast pyruvate kinase 1 as a protein kinase A substrate, and specificity of the phosphorylation site sequence in the whole protein." Biochem J **396**(1): 117-26.

Rannels, S. R., C. E. Cobb, et al. (1985). "The regulatory subunit monomer of cAMP-dependent protein kinase retains the salient kinetic properties of the native dimeric subunit." J Biol Chem **260**(6): 3423-30.

Recouvreux, V., V. Tudisca, et al. (2009). "Regulation of PKA signaling by a differential subcellular localization of Tpk catalytic subunits in Saccharomyces cerevisiae."

Reed, J., J. S. De Ropp, et al. (1989). "Conformational analysis of PKI(5-22)amide, the active inhibitory fragment of the inhibitor protein of the cyclic AMP-dependent protein kinase." Biochem J **264**(2): 371-80.

Remenyi, A., M. C. Good, et al. (2006). "Docking interactions in protein kinase and phosphatase networks." Curr Opin Struct Biol **16**(6): 676-85.

Rhodes, G. (2005). Crystallography Made Crystal Clear: A guide for users of macromolécular models. San Diego, CA, USA., Elsevier/Academic Press.

Roskoski, R., Jr. (1983). "Assays of protein kinase." Methods Enzymol **99**: 3-6.

Rossi, S., M. Guthmann, et al. (1992). "Autophosphorylation of Mucor rouxii cAMP-dependent protein kinase and its role in holoenzyme activation." Cell Signal **4**(4): 443-51.

Shabb, J. B. (2001). "Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase." Chem Rev **101**(8): 2381-411.

Silberstein, S., M. L. Cantore, et al. (1990). "Isolation and characterization of a dimeric cAMP-dependent protein kinase from the fungus Saccobolus platensis." Arch Biochem Biophys **282**(1): 132-40.

Sobko, A. (2006). "Systems biology of AGC kinases in fungi." Sci STKE **2006**(352): re9.

Sorol, M. R., R. L. Pastori, et al. (2000). "Structural and functional analysis of the cAMP binding

domain from the regulatory subunit of Mucor rouxii protein kinase A." Arch Biochem Biophys **382**(2): 173-81.

Su, Y., W. R. Dostmann, et al. (1995). "Regulatory subunit of protein kinase A: structure of deletion mutant with cAMP binding domains." Science **269**(5225): 807-13.

Suh, P. G., J. I. Hwang, et al. (2001). "The roles of PDZ-containing proteins in PLC-beta-mediated signaling." Biochem Biophys Res Commun **288**(1): 1-7.

Sutherland, E. W. (1972). "Studies on the mechanism of hormone action." Science **177**(47): 401-8.

Taylor, S. S., J. Yang, et al. (2004). "PKA: a portrait of protein kinase dynamics." Biochim Biophys Acta **1697**(1-2): 259-69.

Toda, T., S. Cameron, et al. (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**(4): 1371-7.

Toda, T., S. Cameron, et al. (1987a). "Three different genes in S. cerevisiae encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase." Cell **50**(2): 277-87.

Tugarinov, V., J. E. Ollerenshaw, et al. (2005). "Probing side-chain dynamics in high molecular weight proteins by deuterium NMR spin relaxation: an application to an 82-kDa enzyme." J Am Chem Soc **127**(22): 8214-25.

Uno, I., K. Matsumoto, et al. (1982). "Characterization of cyclic AMP-requiring yeast mutants altered in the regulatory subunit of protein kinase." J Biol Chem **257**(23): 14110-5.

Vigil, D., D. K. Blumenthal, et al. (2004b). "Differential effects of substrate on type I and type II PKA holoenzyme dissociation." Biochemistry **43**(19): 5629-36.

Vigil, D., D. K. Blumenthal, et al. (2004a). "Conformational differences among solution structures of the type Ialpha, IIalpha and IIbeta protein kinase A regulatory subunit homodimers: role of the linker regions." J Mol Biol **337**(5): 1183-94.

Viste, K., R. K. Kopperud, et al. (2005). "Substrate enhances the sensitivity of type I protein kinase a to cAMP." J Biol Chem **280**(14): 13279-84.

Walsh, D. A., D. B. Glass, et al. (1992). "Substrate diversity of the cAMP-dependent protein kinase: regulation based upon multiple binding interactions." Curr Opin Cell Biol **4**(2): 241-51.

Walsh, D. A., J. P. Perkins, et al. (1968). "An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle." J Biol Chem **243**(13): 3763-5.

Whitehouse, S., J. R. Feramisco, et al. (1983). "Studies on the kinetic mechanism of the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase." J Biol Chem **258**(6): 3693-701.

Wright, P. E. and H. J. Dyson (1999). "Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm." J Mol Biol **293**(2): 321-31.

Wu, J., S. Brown, et al. (2004b). "RIalpha subunit of PKA: a cAMP-free structure reveals a hydrophobic capping mechanism for docking cAMP into site B." Structure **12**(6): 1057-65.

Wu, J., S. H. Brown, et al. (2007). "PKA type IIalpha holoenzyme reveals a combinatorial strategy for isoform diversity." Science **318**(5848): 274-9.

Wu, J., J. M. Jones, et al. (2004a). "Crystal structures of RIalpha subunit of cyclic adenosine 5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase complexed with (Rp)-adenosine 3',5'-cyclic

monophosphothioate and (Sp)-adenosine 3',5'-cyclic monophosphothioate, the phosphothioate analogues of cAMP." Biochemistry **43**(21): 6620-9.

Yang, J., E. J. Kennedy, et al. (2009). "Contribution of non-catalytic core residues to activity and regulation in protein kinase A." J Biol Chem.

Yang, S., W. H. Fletcher, et al. (1995). "Regulation of cAMP-dependent protein kinase: enzyme activation without dissociation." Biochemistry **34**(19): 6267-71.

Zaremberg, V., A. Donella-Deana, et al. (2000). "Mechanism of activation of cAMP-dependent protein kinase: in Mucor rouxii the apparent specific activity of the cAMP-activated holoenzyme is different than that of its free catalytic subunit." Arch Biochem Biophys **381**(1): 74-82.

Zoller, M. J., A. R. Kerlavage, et al. (1979). "Structural comparisons of cAMP-dependent protein kinases I and II from porcine skeletal muscle." J Biol Chem **254**(7): 2408-12.

Zubay, G., D. Schwartz, et al. (1970). "Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system." Proc Natl Acad Sci U S A **66**(1): 104-10.

Indice de figuras

Figura I.1.	Estructura química del cAMP.	2
Figura I.2.	Reacción de transferencia de fosfato.	2
Figura I.3.	Esquema general de la estructura de la holoenzima.	3
Figura I.4.	Estructura y secuencia de la subunidad Cα.	4
Figura I.5.	Estructura modular de la subunidad regulatoria.	5
Figura I.6.	Estructura de los dominios D/D de RIα.	5
Figura I.7.	Alineamiento de los dominios D/D de RIα, RIIα y RIIβ.	6
Figura I.8.	Alineamiento jerárquico de los dominios de unión a nucleótidos cíclicos.	7
Figura I.9.	Estructuras de los CNBs de RIIβ y de RIα.	8
Figura I.10.	Estructura del PBC del dominio A de RIα y RIIβ.	8
Figura I.11.	Estructura del motivo N3A.	8
Figura I.12.	Estructura del complejo RIIα(90-400)-C.	9
Figura I.13.	Subdominios α-helicoidales de las estructuras de R unida a cAMP y a la subunidad C.	11
Figura I.14.	Estructura de la Tpk1.	12
Figura I.15.	Mecanismos de especificidad en la señal de PKA	14
Figura I.16.	Estructura del dominio D/D de RIIa unido al AKB de D-AKAP2.	15
Figura I.17.	Esquema de la reacción de fosforilación (modelo de Michaelis-Menten).	16
Figura I.18.	Gráfico de Michaelis-Menten.	17
Figura I.19.	Esquema de la reacción de fosforilación en tres pasos.	18
Figura I.20.	Gráfico del cociente de k_{cat} en función de la viscosidad relativa del solvente.	19
Figura I.21.	Técnica de mezclado rápido.	20
Figura I.22.	Modelo de *clamp*.	21
Figura I.23.	Seis celdas unitarias.	23
Figura I.24.	Dispositivo experimental de rayos X simplificado.	24
Figura I.25.	Cristales de proteínas.	25
Figura I.26.	Diagrama de fases para la cristalización por difusión de vapor	26
Figura I.27.	Diagrama del método de gota colgante y de gota sentada.	27
Figura I.28.	Robot de cristalización automática.	28
Figura I.29.	Cristal montado en un *loop*.	29
Figura I.30.	Imagen de difracción.	29
Figura I.31.	Equipo de difracción.	30
Figura I.32.	Sincrotrón.	31
Figura I.33.	Celda unitaria.	31
Figura I.34.	Los índices de Miller.	32
Figura I.35.	Representación bidimensional de la construcción de Ewald.	33
Figura I.36.	Las coordenadas de Bcy1 en las etapas iniciales de la resolución de estructura.	36
Figura II.1.	Clasificación general de los hongos.	42
Figura II.2.	Esquema que representa los dos grupos de secuencias de subunidades R de hongos.	43
Figura II.3.	Alineamiento de la zona bisagra.	43
Figura II.4.	Alineamiento múltiple del dominio D/D.	46
Figura II.5.	Alineamiento jerárquico de la región de las subunidades R de hongos y de mamíferos.	47-50
Figura II.6.	Estructuras del dominio D/D de la subunidad RIIα unida al dominio AKB de D-AKAP2.	52
Figura II.7.	Estructuras del dominio D/D de la subunidad RIIα unida al dominio AKB de D-AKAP2.	52

Figura III.1.	Gradiente de sacarosa de la PKA de *S.cerevisiae* y de *N.crassa*.	59
Figura III.2.	Curva de calibración de coeficiente de sedimentación.	60
Figura III.3.	Esquema de Bcy1 y Δ85Bcy1 y alineamiento del extremo N-terminal de la subunidad R.	61
Figura III.4.	Gradiente de sacarosa de Bcy1 y Δ85Bcy1.	62
Figura III.5.	Esquema de D-AKAP2.	64
Figura III.6.	Interacción *in vitro* del extremo N-terminal de Bcy1 y el dominio AKB de la AKAP D-AKAP2.	64
Figura III.7.	Esquema de las holoenzimas de *S.cerevisiae* y *N.crassa*.	65
Figura IV.1.	Actividad quinasa de C_{Mr}, C_{Sc} y C_b de diferentes cantidades de enzima.	69
Figura IV.2.	Actividad quinasa de C_{Mr}, C_{Sc} y C_b a diferentes tiempos de incubación.	70
Figua IV.3.	Curvas de sustrato correspondientes a las tres subunidades C.	71
Figura IV.4.	Parámetros cinéticos de los péptidos sustrato por parte de C_{Mr}, C_{Sc} and C_b.	72
Figura IV.5.	Eficiencias catalíticas relativas para los péptidos sustratos.	73
Figura IV.6.	Efecto de la viscosidad del medio en los parámetros cinéticos.	74
Figura IV.7.	Efecto de los péptidos 18-A sobre la fosforilación del kemptido.	76
Figura IV.8.	Efecto de 10Nt-M sobre la fosforilación del kemptido por C_{Mr}.	77
Figura IV.9.	Efecto de 18-A-S sobre la fosforilación de Pyk1 por parte de C_{Sc}.	78
Figura IV.10.	Efecto de R_{Mc} sobre la fosforilación del kemptido por C_{Mc} y C_b.	79
Figura IV.11.	Modelo de la subunidad R como modulador dual de la actividad de PKA.	81
Figura V.1.	Comparación de las estructuras de RIα unida a la subunidad C y a cAMP.	85
Figura V.2.	Purificación de Δ85Bcy1.	87
Figura V.3.	Análisis de la preparación de proteína luego de dos semanas.	88
Figura V.4.	Construcciones de fragmentos de Bcy1.	89
Figura V.5.	Purificación de Bcy1(168-416).	89
Figura V.6.	Fotos de cristales.	91
Figura V.7.	Estructura general de los dominios CNB de Bcy1.	93
Figura V.8.	Alineamiento de los dominios CNB de Bcy1, RIα y RIIβ.	93
Figura V.9.	Estructuras de Bcy1, RIα y RIIβ.	94
Figura V.10.	Dominios CNB de Bcy1, RIα y RIIβ superpuestos.	95
Figura V.11.	PBC de Bcy1, RIα y RIIβ.	96
Figura V.12.	Comparación de los subdominios α, que unen el dominio A y el B de Bcy1, RIα y RIIβ.	96
Figura V.13.	Superficie de contacto entre los dominios A y B de Bcy1.	97
Figura V.14.	Comunicación entre el dominio A y el dominio B de RIα y RIIβ.	98
Figura V.15.	Estructura de Bcy1 y de la subunidad RIα.	98
Figura VII.1.	Análisis de la calidad de los modelos de los dominios D/D de *S. cerevisiae* y *M. rouxii*.	111
Figura VII.2.	Gráfico de Ramachandran de la estructura de los dominios CNB de Bcy1.	117
Figura VII.3.	Purificación de holoenzima.	124
Figura VII.4.	Purificación de la subunidad C.	124
Figura VII.5.	Purificación de Pyk1.	125
Figura VII.6.	Purificación de Bcy1 y Δ85Bcy1.	126

Indice de tablas

Tabla II.1.	Residuos identificados por CHAIN.	51
Tabla III.1.	Coeficientes de sedimentación.	60
Tabla III.2.	Coeficientes de sedimentación de la PKA.	60
Tabla III.3.	Coeficientes de sedimentación.	63
Tabla IV.1.	Péptidos sintéticos derivados de R_{Mr} y R_{Sc}.	70
Tabla IV.2.	K_m de los péptidos sustrato para C_{Mr}, C_{Sc} y $C_{b.}$	72
Tabla IV.3.	Eficiencia catalítica de C_{Mr}, C_{Sc} y C_b para los péptidos sustratos.	72
Tabla IV.4.	Pendientes obtenidas de la figura IV.4.	75
Tabla V.1.	Estructuras de los dominios D/D y CNB de las subunidades R.	84
Tabla V.2.	Resolución de la estructura.	93
Tabla V.3.	Predicción de la interacción R-C en levaduras.	100
Tabla VII.1.	Colección de datos.	113
Tabla VII.2.	Procesamiento de datos.	114
Tabla VII.3.	Resolución de la estructura.	115
Tabla VII.4.	Parámetros de validación.	116