Revista de la Facultad de Ciencias Médicas
TERCERA ÉPOCA
Diciembre 2015 | Vol 5 Nº3

2015 Diciembre, 5(3): 1-1

IDENTIFICACIÓN DE SUSTRATOS FOSFORILADOS POR LA PKA DE YARROWIA LIPOLYTICA MEDIANTE TÉCNICAS DE PROTEÓMICA COMPARATIVA

Díaz Ludovico I; Giacometti R; Passeron MS; Kronberg MF

Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (INBA), CONICET-FAUBA.
Av. San Martín 4453, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (C1417DSE), Argentina.
diazludovico@med.unlp.edu.ar

Introducción

La proteína quinasa A (PKA) es una enzima involucrada en la regulación de numerosos procesos celulares; ésta cataliza la transferencia de un grupo fosfato del ATP a sus proteínas diana de manera dependiente a la concentración intracelular de AMPc. La PKA se encuentra altamente conservada en eucariotas. En Yarrowia lipolytica, un hongo dimórfico ampliamente utilizado como modelo de estudio en biología celular, la PKA está involucrada en la regulación de la morfogénesis, el metabolismo y en la adaptación a condiciones de estrés. Llamativamente, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los organismos, en Y. lipolytica la deleción del gen TPK1 que codifica la subunidad catalítica de la PKA es viable, convirtiendo a este hongo en una excelente herramienta para el estudio de la vía de transducción de señales celulares que posee como segundo mensajero al AMPc.

Objetivos

Optimizar una estrategia para identificar proteínas diana de la PKA de Y. lipolytica mediante el análisis comparativo de proteínas inmunoenriquecidas de una cepa salvaje y de una mutante sin actividad PKA (Δtpk1).

Materiales y métodos

Se acopló un anticuerpo monoclonal anti-fosfoRRX(S/T) (péptido sustrato de la PKA) a la resina proteína A-sefarosa por el método del dimetilpimelimidato. Con esta inmunoresina se enriquecieron en fosfoproteínas extractos proteicos obtenidos de las cepas salvaje y mutante. Las fosfoproteínas obtenidas se separaron por 2D-PAGE, se seleccionaron aquellos spots presentes en el patrón de la cepa salvaje y ausentes en la cepa sin actividad PKA, y se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF y MALDI-TOF-TOF. Finalmente, se identificaron las proteínas por mapeo peptídico por comparación de espectros de masas (Peptide Mass Fingerprint).

Resultados

Del total de spots analizados, fue posible identificar como putativas proteínas sustrato de la PKA de Y. lipolytica el factor de elongación 1-α (EF1-α), la subunidad regulatoria de la PKA (RKA1) y una proteína putativa con homología a la monooxigenasa de la biosíntesis de ubiquinona CoQ6 de Saccharomyces cerevisiae.

Conclusiones

El protocolo desarrollado demostró ser una herramienta confiable para la identificación de sustatos fosforilables por PKA en Y. lipolytica. Los resultados que podrán obtenerse ejecutando esta estrategia marcan un punto de partida importante para el estudio de las vías y procesos celulares regulados por la PKA no solo en Y. lipolytica sino también en otros organismos eucariotas.

Palabras claves

Yarrowia lipolytica
Proteína quinasa dependiente de AMPc
Fosfoproteómica