Identification of potential substrates of *Yarrowia lipolytica* PKA by comparative proteomic analysis

[1]Díaz Ludovico, I.; [1]Gonzalez, M.C.; [2]Giacometti, R.; [2]Passeron, S.; [2]Kronberg, M.F.
[1]INIBIOLP-CONICET, Facultad de Cs. Médicas, UNLP. La Plata, Argentina. E-mail: diazludovico@gmail.com
[2]INBA-CONICET, Facultad de Agronomía, UBA. Buenos Aires, Argentina.

Introduction & Objetives:

The cAMP-dependent protein kinase (PKA) is an enzyme that engages the transference of a phosphate group of ATP to its target protein; its activity is regulated by intracellular cAMP concentration. In *Yarrowia lipolytica*, a dimorphic fungus of biotechnological interest, we found that PKA is involved in morphogenesis, cell metabolism and adaptation to stress conditions[1,2]. The regulatory and catalytic subunits of PKA are encoded by sole genes: RKA1 and TPK1, respectively [1,2,3]. In this work, proteomics and molecular biology techniques were adapted to identify potential target proteins of *Y. lipolytica* PKA´s. The strategy used was based on comparison of immunoenriched proteins with an antiphospho-PKA substrate antibody from a wild type strain (PO1A) and a mutant strain without PKA activity (Δtpk1).

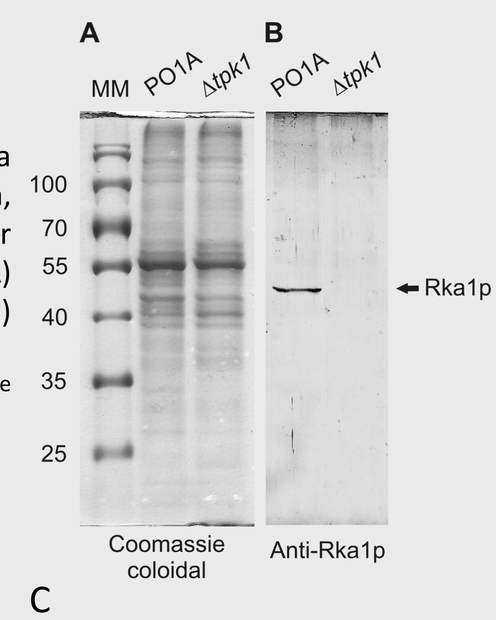
Materiales & Métodos:

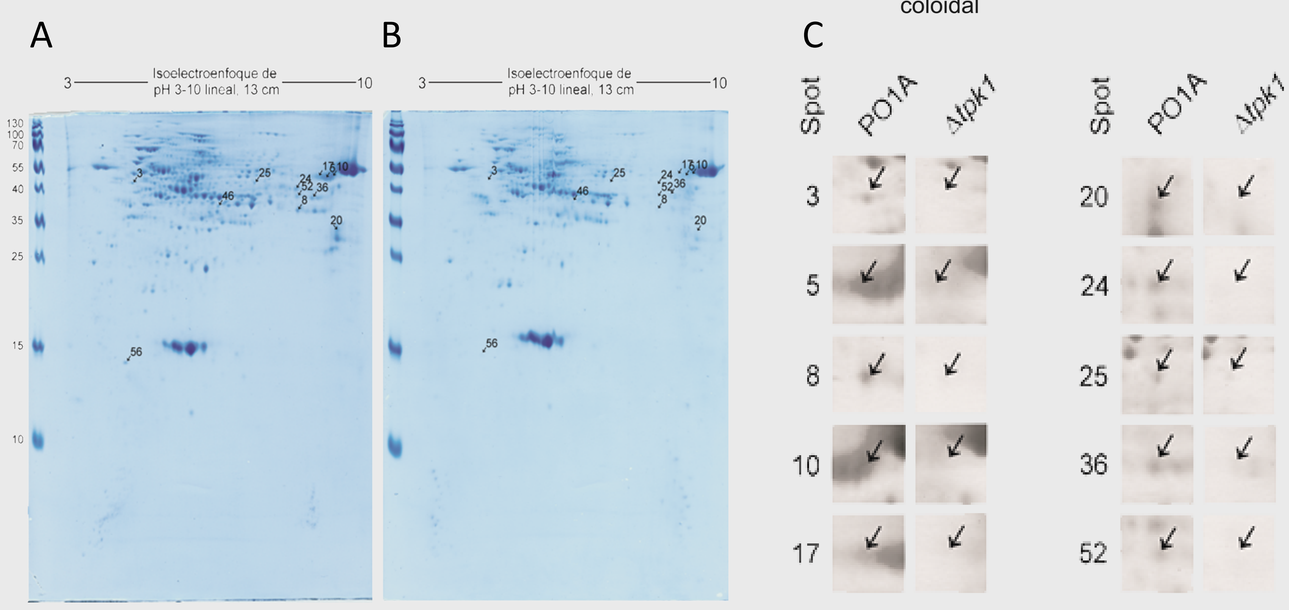
- **Cultivos celulares**: Las cepas de *Y. lipolytica* PO1A (INRA, Francia) y Δtpk1 (Cervantes-Chávez *et al.*, 2009) se cultivaron en medio YPD a 28°C y 200 r.p.m. hasta fase estacionaria temprana. Los extractos celulares se prepararon por vortexeo con perlitas de vidrio en buffer IP con inhibidores de proteasas y fosfatasas.
- **Enriquecimiento fosfoproteico:** Los extractos celulares se enriquecieron en fosfoproteínas por cromatografía de inmunoafinidad. La resina fue generada por el método del DMP uniéndose covalentemente un anticuerpo monoclonal anti-fosfoSustrato de la PKA (anti-RRX(S/T)p) (Cell Signaling Tech,) a la proteína A sefarosa.
- **Separación de proteínas:** Los extractos inmunoenriquecidos se resolvieron por electroforesis bidimensional (2D-PAGE) y se tiñeron por el método del *coomassie* coloidal. Los geles se digitalizaron y mediante análisis *in silico* por software Delta2D (DECODON GmbH) se seleccionaron los spots para su posterior identificación.
- **Análisis de proteínas:** Las proteínas se identificaron por espectrometría de masas MALDI-TOF mediante la técnica de la huella peptidica y se verificaron las secuencias por fragmentación MS/MS de algunos picos.

Resultados:

- **Inmunoenriquecimiento en fosfoproteínas:** Un análisis previo evidencia la eficiencia en el proceso de inmunoenriquecimiento (datos no mostrados) mientras que la imagen 1 muestra la especificidad de la inmunoresina.
- **Separación de fosfoproteínas:** Los extractos inmunoenriquecidos se resolvieron por electroforesis bidimensional 2D-PAGE obteniendose los spots mostrados en la figura 2 A y B.
- **Selección diferencial de spots:** Por análisis *in silico* de las digitalizaciones de los geles se seleccionaron los 10 spots mostrados en 2 C, para analizar por espectrometría de masas.
- **Identificación de proteínas por MALDI-TOF:** La tabla 3 enumera las proteínas identificadas obtenida por asignación de un *score* a los fragmentos peptídicos obtenidos por tripsinización y posterior MALDI-TOF.

1. Inmunoenriquecimiento de fosfoproteínas.
El enriquecimiento en fosfoproteínas por la resina anti-fosfoSustrato de la PKA Proteína A-sefarosa, muestra la eficiencia del inmunoenriquecimiento por revelado con *coomassie* coloidal como control en (A) y el Western-blot con anticuerpo anti-Rka1p en (B) muestra la especificidad del inmunoenriquecimiento.
Análisis de las proteínas enriquecidas de cepas *wt* (PO1A) y mutante (Δtpk1). MM marcadores de peso molecular.





Spot	MM en gel (kDa)	Núm. De acceso[1]	MM teórica (kDa)	Descripción
3	41	YALI0C04422g	40	Subunidad regulatoria de la PKA
5	44	YALI0C09141p	50	EF1-α
8	32	YALI0C09141p	50	EF1-α
10	45	YALI0C09141p	50	EF1-α
17	45	YALI0C09141p	50	EF1-α
20	28	YALI0C09141p	50	EF1-α
24	39	YALI0C09141p	50	EF1-α
25	41	YALI0C09042p	51	Putativa ubiquinona monooxigenasa COQ6
36	35	YALI0C09042p	51	EF1-α
52	36	YALI0C09042p	51	EF1-α

3. Tabla de identificación de spots.
[1]Número de acceso para base de datos http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/YALI. MM, masa molecular

2. Spots significativos.
Identificados por análisis *in silico* con el software Delta2D (DECODON GmbH) por comparación de las diferencias de intensidad entre la cepa *wt* (PO1A) y mutante (Δtpk1). Estos spots fueron seleccionados para ser identificados por MALDI-TOF.
Digitalización de geles teñidos por *coomassie* coloidal en A: *wt* (PO1A) y B: Δtpk1. C:Ampliación de los spots (en escala de grises) seleccionados.

Conclusiones:

- Se logró poner a punto una técnica eficiente para el enriquecimiento en proteínas fosforiladas en la *secuencia* target de la PKA.
- Se realizó la identificación teórica de los sustratos putativos de la PKA de *Y. lipolytica* EF1-α; una proteína con homología a la monooxigenasa de la biosíntesis de ubiquinona Coq6 de *S. cerevisiae* y la subunidad regulatoria Rka1 de la PKA.
- Se demostró la posibilidad de utilizar anticuerpos contra fosfoserina/treonina para la realización de un estudio global de las proteínas target de la PKA. Si bien el inmunoenriquecimiento con este anticuerpo involucra interacciones inespecíficas; al contar con el modelo de cepas Δtpk1/wt se logra descartar las proteínas contaminantes por un análisis comparativo.

REFERENCIAS:
1. Cervantes-Chávez, J., & Ruiz-Herrera, J. (2007). FEMS Yeast Res 7: 929-940.
2. Cervantes-Chavez, J.A., Kronberg, F., Passeron, S., & Ruiz-Herrera, J. (2009). Fungal Genet Biol 46: 390-399.
3. Kronberg F., Giacometti R., Ruiz-Herrera J., Passeron S. (2011). Archives of Biochemestry and Biophysics 509: 66-75

Trabajo subsidiado por:
- CONICET: PIP 00169
- AGENCIA: PICT 00787-2006