

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

¹Díaz Ludovico, I.; ¹Gonzalez, M.C.; ²Giacometti, R.; ²Passeron, S.; ²Kronberg, M.F.

¹INIBIOLP-CONICET, Facultad de Cs. Médicas, UNLP. La Plata, Argentina. E-mail: diazludovico@gmail.com

²INBA-CONICET, Facultad de Agronomía, UBA. Buenos Aires, Argentina.

Introduction & Objectives:

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 (Δ tpk1).

Materiales & Métodos:

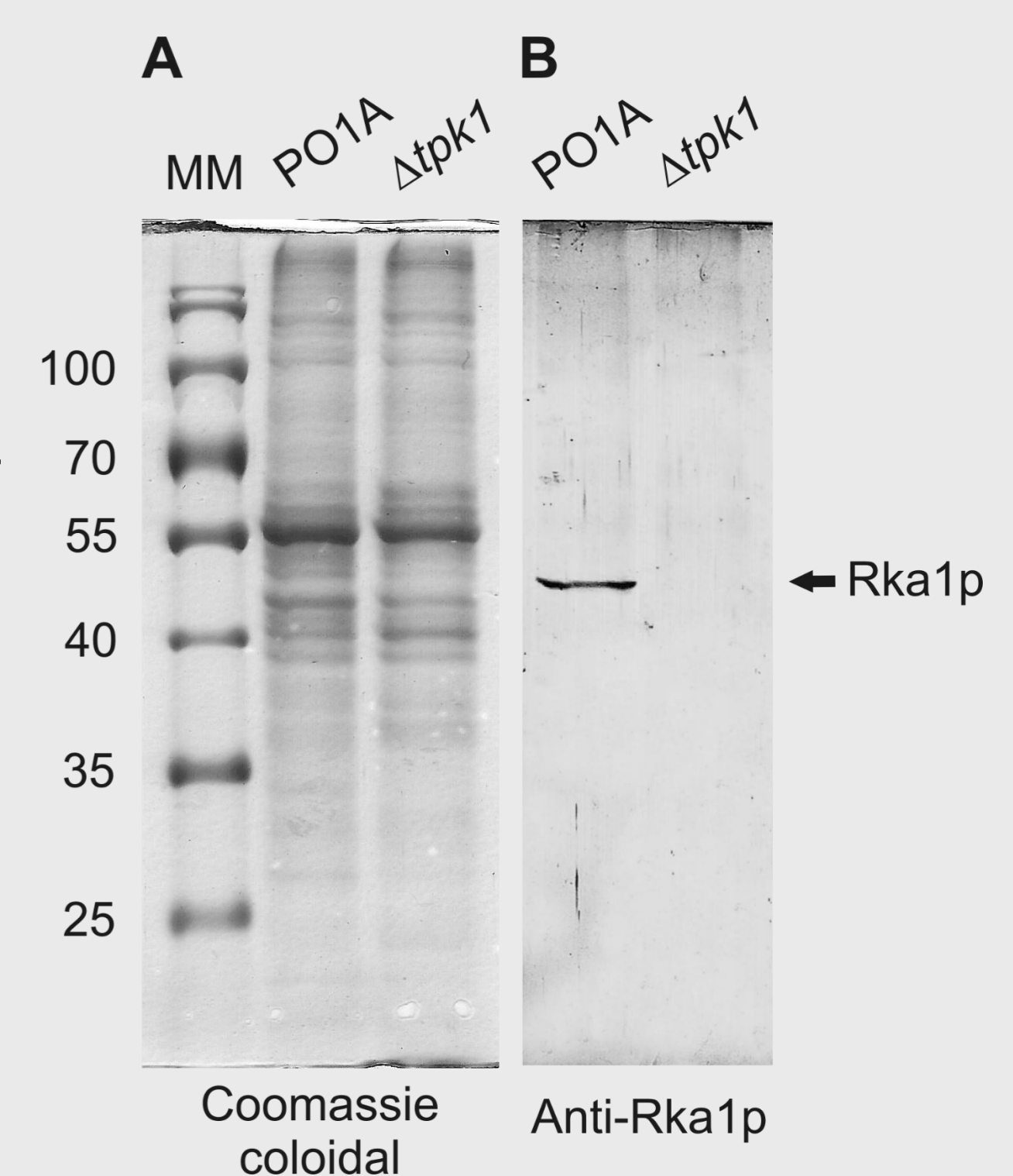
- **Cultivos celulares:** Las cepas de *Y. lipolytica* PO1A (INRA, Francia) y Δ tpk1 (Cervantes-Chávez *et al.*, 2009) se cultivaron en medio YPD a 28°C y 200 r.p.m. hasta fase estacionaria temprana. Los extractos celulares se prepararon por vortexeo con perlitas de vidrio en buffer IP con inhibidores de proteasas y fosfatasa.
- **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 seferosa.
- **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 peptídica 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 inmuno-resina.
- **Separación de fosfoproteínas:** Los extractos inmunoenriquecidos se resolvieron por electroforesis bidimensional 2D-PAGE obteniéndose 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.

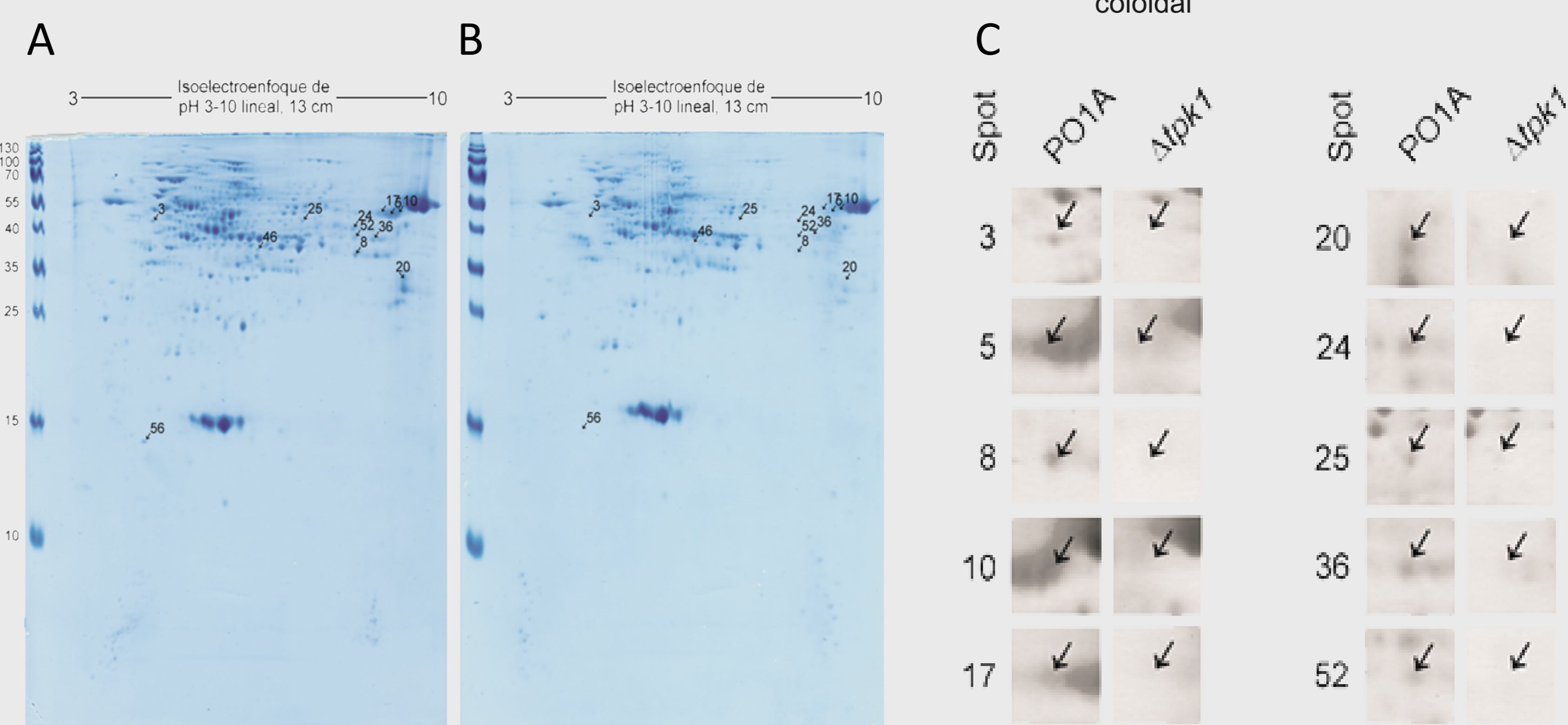
El enriquecimiento en fosfoproteínas por la resina anti-fosfoSustrato de la PKA Proteína A-seferosa, muestra la eficiencia del inmunoenriquecimiento por revelado con *coomassie* coloidal como control en (A) y el Western-blot con anticuerpo anti-Rka1p en (B) muestra la especificidad del inmunoenriquecimiento. Análisis de las proteínas enriquecidas de cepas wt (PO1A) y mutante (Δ tpk1). MM marcadores de peso molecular.



Spot	MM en gel (kDa)	Núm. De acceso ¹	MM teórica (kDa)	Descripción
3	41	YALIOC04422g	40	Subunidad regulatoria de la PKA
5	44	YALIOC09141p	50	EF1- α
8	32	YALIOC09141p	50	EF1- α
10	45	YALIOC09141p	50	EF1- α
17	45	YALIOC09141p	50	EF1- α
20	28	YALIOC09141p	50	EF1- α
24	39	YALIOC09141p	50	EF1- α
25	41	YALIOC09042p	51	Putativa ubiquinona monooxigenasa COQ6
36	35	YALIOC09042p	51	EF1- α
52	36	YALIOC09042p	51	EF1- α

3. Tabla de identificación de spots.

¹Número 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 (Δ tpk1). Estos spots fueron seleccionados para ser identificados por MALDI-TOF.

Digitalización de geles teñidos por *coomassie* coloidal en A: wt (PO1A) y B: Δ tpk1. 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 Δ tpk1/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 Biochemistry and Biophysics 509: 66-75