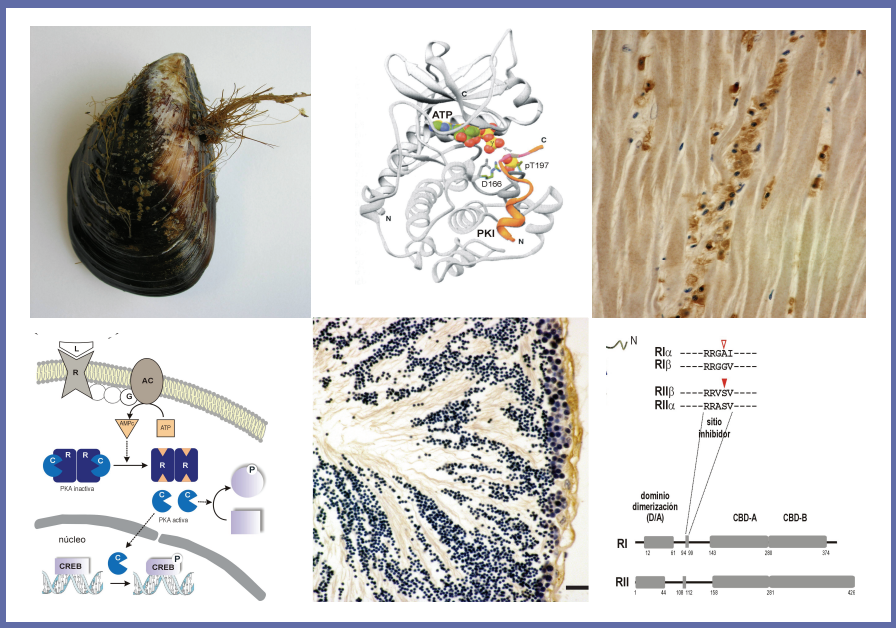
José Ricardo Bardales Azañero



TESIS DOCTORAL

ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc EN EL MOLUSCO BIVALVO *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS.* PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y DISTRIBUCIÓN TISULAR

Instituto de Acuicultura
Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular
Facultade de Veterinaria

INSTITUTO DE ACUICULTURA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOXÍA MOLECULAR
Facultade de Veterinaria

ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc EN EL MOLUSCO BIVALVO *Mytilus galloprovincialis*. PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y DISTRIBUCIÓN TISULAR

Memoria presentada por
D. **José Ricardo Bardales Azañero**
para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Santiago de Compostela

José Antonio Villamarín Cid, Profesor Titular do Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular da Universidade de Santiago de Compostela

INFORMA

Que a presente Tese de Doutoramento titulada **«Isoformas de la proteína quinasa dependiente de AMPc en el molusco bivalvo *Mytilus galloprovincialis*. Purificación, caracterización funcional y distribución tisular»**, foi realizada por **D. José Ricardo Bardales Azañero** baixo a miña dirección, no laboratorio de bioquímica da Facultade de Veterinaria, e estando concluída, autorizo a súa presentación para que poida ser xulgada polo Tribunal correspondente.

Lugo, 2 de outubro de 2007.

- Esta Tesis Doctoral se ha realizado dentro del proyecto de investigación «Estudio do papel de adenosina como sinal extracelular e o seu mecanismo de transducción na adaptación a hipoxia do mexillón *Mytilus galloprovincialis*» (PGIDIT02RMA26101PR), financiado por la Secretaria Xeral de Investigación e Desenvolvemento de la Xunta de Galicia.

- J. R. Bardales Azañero ha sido beneficiario de una «Bolsa Predoutoral para estudiantes iberoamericanos» de la Universidad de Santiago de Compostela, cofinanciada por el Vicerrectorado de Relaciones Institucionales y el Instituto de Acuicultura.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas instituciones y personas que, directa o indirectamente han depositado su confianza en mi persona, en algunos casos sin conocerme, y me han ayudado a que este trabajo de investigación culmine de forma exitosa, pero de manera muy especial:

Quiero testimoniar públicamente mi más profunda gratitud y eterno agradecimiento a mi Director de Tesis Doctoral, el profesor Dr. Antonio Villamarín Cid, por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, aún conociendo mis errores y torpezas de mi formación en Bioquímica; fue él quien me ha guiado en el riguroso camino de la investigación, con sus virtudes de investigador y amigo, unido a sus nobles valores humanos y vocación de servicio a mi persona, que siempre estuvo pendiente, con su ayuda inestimable y respondiendo con toda amabilidad a todas mis preguntas y dudas.

De la misma manera agradezco a mi tutor profesor Dr. Oscar García Martín, por haberme permitido realizar mis estudios de doctorado en Biología Marina, por su tiempo, paciencia y valioso apoyo en los continuos viajes a Lugo hasta encontrar el grupo de investigación para realizar mis estudios, y de manera muy especial por su amistad brindada a mi persona.

A los profesores del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela: Dr. Ignacio Ramos Martínez, por aceptarme en primera instancia en su grupo de investigación, Dr. José Luís Rodríguez, Dra. Izaskun Ibarguren, Dr. Ramiro Barcia y Dra. Concepción Sarandeses, muchas gracias por el inmenso apoyo que me han brindado, y haberme hecho sentir constantemente parte del brillante grupo de extraordinarios profesionales de trayectoria internacional y muy destacados en trabajos de investigación científica, que son punteros y reconocidos a nivel mundial. Sinceramente me hicieron sentir como si estuviera con mi propia familia en Perú.

A la profesora Dra. Ana Mª. Bravo del Moral y al Dr. José Luís Cascallana, por su inestimable ayuda y orientación en el desarrollo de las técnicas de inmunohistoquimica.

A la profesora Dra. María do Carme García por haberme permitido realizar los estudios de Economía Pesquera.

Al Dr. Emilio Itarte, de la Universidad Autónoma de Barcelona, por su generosa donación de CK2 humana recombinante.

Al Dr. Hulf Hellman, del Ludwig Institute for Cancer Research de Uppsala, por su aportación en la secuenciación de péptidos.

A mis compañeros de trabajo del laboratorio de Bioquímica, los Doctores Javier, Armando, María José y Ana; Pablo, Martín, Sonia, y a todos que me brindaron su amistad, apoyo moral y muchos momentos de felicidad durante mi estadía.

A mis nuevos amigos que he tenido la fortuna de conocer en España: Henry, Micquele, Cathy, Ramón, Patri y Julio, por compartir las diversas gastronomía de nuestros países y por los muchos viajes turísticos llenos de vértigo realizados por Europa; también para Mishqui, Ana, Roy, Teo, Wily, Juan, Mónica, Álvaro, Dely, Lucia, Gerardo, Cristina, Walter, Emilio, Miguel, Rebeca, Martiño, los sacerdotes Daniel, Antonio, Jesús y José, que siempre me ilustraron sobre la palabra de Dios. A Begoña, Elena, Carlos, Fabián, Galia, Lena; que me disculpen los que involuntariamente e obviado mencionarlos, porque fueron tantas las muestras de cariño, aprecio, y ayuda incondicional, tanto material como espiritual a mi persona, que no los podré olvidar nunca.

A Máximo, Fernando, Fidel, Paco, José, Mariajo y Fátima; Concha, Mila, personal administrativo y de servicio de la Residencia Universitaria «Jesús Bal y Gay», por brindarme su hospitalidad, amistad y apoyo en todo momento, haciendo mi estancia muy agradable durante todo el tiempo que he permanecido alojado.

Por todos estos hechos (…) una vez más, eternamente y siempre; gracias ¡Galicia-España!.

A todos los profesores y compañeros de estudios de la Facultad de Pesquería, de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú; especialmente a los integrantes del ex–Departamento de Extracción Pesquera, muchas gracias por brindarme sus enseñanzas, consejos, amistad y por los muchos momentos saboreando nuestro delicioso «cebiche».

También quiero agradecer a Arturo Cárdenas, Juana Morales, Dolores Pérez, Manuel Fontan, Sandra Fernández, Carmen Valverde, Laura Bugallo, Gonzalo Gesto y Haydeé Quispe, que supieron brindarme su apoyo, amistad y palabras de aliento en el momento justo en que más lo requería y por su insistencia para realizar mis estudios de doctorado.

De manera muy especial a toda esa gente de espíritu progresista, anónima y olvidada de muchos lugares del «Perú profundo», como mi pueblo querido «Santa María-Matara» (lugar de mis primeros 15 años de vida), donde tuve las primeras enseñanzas de muchos profesores y amigos, creo yo, que además se puede ser muy feliz con tan sólo el regalo de una sonrisa.

Por último, pero no menos importante a mi familia: a mi padre Enrique (QEPD) y de manera muy especial a quien es mi inspiración constante, mi madre Doña Tila Azañero Rocha, quien asumió las responsabilidades de padre y madre, me brindó su apoyo necesario en el momento preciso, inculcándome grandes ideales, y sin ser maestra, me ha dado las mejores enseñanzas. A mis hermanos por estar juntos a mí, a pesar de la distancia geográfica, quienes con su cariño me motivan constantemente a tratar de ser mejor en cada aspecto de la vida, a Elvira, Felipa, Pedro, María, Lorenzo Abraham y Gilberto, con este ultimo compartimos nuestra infancia entre tristezas y alegrías; cada uno de ellos tienen algo muy bello dentro de su ser, como Pedro con su carácter

fuerte pero con una gran calidad humana. A todos mis sobrinos, en especial a Mercedes, Lucidio, Edith, Nashla, Jenny, Antonio, Iván, y que me perdonen si no los nombro a todos. A mis tíos: Esperanza, Julio, Félix y Catalina, que físicamente ya no están, por habernos adelantado en el camino de la vida, a mi tío Segundo. A todos mis primos: Olga, Wilmer, Victoria, Arturo, Myrna, también que me perdonen si no los nombro a los demás; ya que, con primos y sobrinos compartimos muchos momentos de alegría en la ciudad de Casa Grande durante la época escolar.

A todos muchas gracias.

A B R E V I A T U R A S

AC	adenilato ciclasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	adenosina-5′-difosfato
AGC	grupo de proteína quinasas PK*A*, PK*G*, PK*C*
AKAP	*A*-*k*inase *a*nchor *p*rotein (proteína de anclaje de PKA
AKIP	*A*-kinase *i*nteracting *p*rotein (proteína que interacciona con PKA)
Ala (A)	alanina
AMP	adenosina-5´-monofosfato
AMPA	α-*a*mino-3-hydroxy-5-*m*ethylisoxazole-4- *p*ropionic *a*cid
AMPc	adenosina-3′,5′-monofosfato cíclico
AMP-PNP	análogo del ATP (con N entre los fosfatos β y γ)
Api	apigenina
aPK	*a*typical *p*rotein *k*inase (proteína quinasa atípica)
Arg (R)	arginina
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
Asn (N)	asparagina
Asp (D)	ácido aspártico
ATP	adenosina-5′-trifosfato
BSA	seroalbúmina bovina
C	subunidad catalítica de la PKA
CAF	*c*hemically *a*ssisted *f*ragmentation
CAF-PSD	*c*hemically *a*ssisted *f*ragmentation-*p*ost *s*ource *d*ecay
CAMK	*cal*m*o*duline-dependent protein *k*inase (proteína quinasa dependiente de calmodulina)
CAP	*c*atabolite *a*ctivator *p*rotein (proteína que promueve la transcripción del operón *lac* en *E. coli*)
CBD	*c*AMP-*b*inding *d*omain (dominio de unión de AMPc)
CDK	*c*yclin-*d*ependent protein *k*inase (proteína quinasa dependiente de ciclina)
CK2	*c*asein *k*inase 2 (caseín quinasa 2)
CK2α	subunidad catalítica de CK2
CK2β	subunidad reguladora de CK2
CKI	casein kinase I (caseína quinasa I)
CLK	*c*dc2-*l*ike protein *k*inase

cpm	cuentas por minuto
CRE	cAMP-*r*esponse *e*lement
CREB	*c*AMP-*r*esponse *e*lement *b*inding-protein (factor de transcripción)
Cys (C)	cisteína
D/A	dimerización/acoplamiento
DAB	3,3´-diaminobenzidina
D-AKAP	*d*ual-AKAP (AKAP que puede interaccionar con RI y con RII)
DEAE	dietilaminoetil
DHB	ácido 2,5-dihydroxibenzoico
DTT	DL-ditiotreitol
E	enzima
E_a	energía de activación
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EGF	*e*pidermal *g*rowth *f*actor (factor de crecimiento epidérmico
EGTA	ácido etilenglicol tetracético
Emo	emodina
ePK	*e*ukaryotic *p*rotein *k*inase (proteína quinasas de eucariotas, o típicas)
FPLC	*F*ast *p*rotein *l*iquid *c*hromatography
FSBA	p-fluorosulfonil benzoil 5′-adenosina
Gln (Q)	glutamina
Glu (E)	ácido glutámico
Gly (G)	glicina
GMPc	3′,5′-guanosina monofosfato cíclico
GPCR	*G p*rotein-*c*oupled *r*eceptor (receptor de membrana acoplado a proteínas G)
GSK3	*g*lycogen *s*ynthase *k*inase 3 (proteína quinasa 3 de la glucógeno sintasa)
GTP	guanosina-5′-trifosfato
HCCA	ácido 4-hidroxi-α-cianocinámico
His (H)	histidina
IEF	isoelectroenfoque
Ile (I)	isoleucina
JAK	*J*anus *k*inase o *j*ust *a*nother *k*inase (proteína quinasas Jano)
K_a	constante de activación
K_{cat}	constante catalítica
kDa (K)	kilodalton
K_m	constante de Michaelis-Menten
Ł	isoleucina /leucina
L-DOPA	3,4 dihidroxi-L-fenilalanina

Leu (L)	leucina
Lys (K)	lisina
MAK	*m*itogen-*a*ctivated protein *k*inase =MAP kinase (proteína quinasa activada por mitógenos)
MALDI	*m*atrix-*a*ssisted *l*aser *d*esorption *i*onization
MAP	músculo aductor posterior
MAP-2	*m*icrotubule *a*ssociated *p*rotein-2 (proteína 2 asociada a microtúbulos)
MARB	músculo anterior retractor del biso
MPRB	músculo posterior retractor del biso
Met (M)	metionina
MS	*m*ass spectrometry (espectrometría de masas)
n_H	coeficiente de Hill
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBC	*p*hosphate *b*inding *c*assette (casete de unión de fosfato)
PBS	tampón fosfato salino
PDB	*p*rotein *d*ata *b*ank (banco de datos de estructuras 3D de proteínas)
PDK	*p*hosphoinositide-*d*ependent protein *k*inase (proteína quinasa dependiente de fosfoinosítido)
Phe (F)	fenilalanina
pI	pH isoeléctrico
Pi, P	fosfato inorgánico
PIP3	fosfatidilinositol trifosfato
PK	*p*rotein *k*inase (proteína quinasa)
PKA	proteína quinasa A, proteína quinasa dependiente de AMPc
PKC	proteína quinasa C
PKG	proteína quinasa dependiente de GMP
PKI	*p*rotein *k*inase A *i*nhibitor (proteína inhibidora de PKA)
PKI_{5-24}	péptido de 20 aminoácidos derivado de PKI
PKR	*p*rotein *k*inase *r*esource
PMF	*p*eptide *m*ass *f*ingerprinting (huella peptídica)
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro
pO_2	presión parcial de oxigeno
PP2A	*p*rotein *p*hosphatase 2A (proteína fosfatasa 2A)
Pro (P)	prolina
PS20	péptido sustrato de 20 aminoácidos
PVDF	fluoruro de polivinildieno
R	subunidad reguladora de la PKA

RGC	receptor guanilato ciclasa
RI	subunidad reguladora tipo I
RII	subunidad reguladora tipo II
RMN	resonancia magnética nuclear
rpm	revoluciones por minuto
S	sustrato
SAXS	*s*mall-*a*ngle X-*r*ay *s*cattering (dispersión de rayos X de ángulo pequeño)
SDS	dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
Ser (S)	serina
(dominio) SH	*s*rc *h*omology (dominio con homología en el producto del oncogen src)
STAT	*s*ignal *t*ransducer and *a*ctivator of *t*ranscription
STE	*st*erile *k*inase
TEMED	tetrametiletilendiamina
TFA	ácido trifluroacético
Thr (T	treonina
TK	*t*irosin *k*inase (tirosina quinasa)
TKL	*t*irosine *k*inase *l*ike
TOF	*t*ime *o*f *f*light (tiempo de vuelo, tipo detector en espectrometría de masas)
TRIS	tris (hidroximetil)aminometano
Trp (W)	triptófano
TTBS	tampón Tris salino + tween
Tyr (Y)	tirosina
UV	ultra violeta
Val (V)	valina
V_{max}	velocidad máxima
V_o	velocidad de reacción inicial
v-src	virus del sarcoma de Rous

INDICE

INTRODUCCIÓN **1**

1.1. Fosforilación de proteínas: breve historia 3
1.2. Proteína quinasas 8
1.2.1. Clasificación ***8***
1.2.2. Regulación de la actividad ***12***
1.2.3. Bases de datos y recursos «on-line» de interés en el estudio de proteína quinasas ***13***
1.3. Proteína quinasa dependiente de AMPc 16
1.3.1. Estructura general y especificidad ***16***
1.3.2. Subunidad catalítica, C ***19***
1.3.2.1. Isoenzimas 20
1.3.2.2. Modificaciones post-traduccionales 24
1.3.2.2.1. Fosforilación *24*
1.3.2.2.2. Miristilación *26*
1.3.2.2.3. Desamidación *27*
1.3.2.3. Estructura de la subunidad C 28
1.3.2.3.1. Estructura global *28*
1.3.2.3.2. Sitio de unión de MgATP *33*
1.3.2.3.3. Sitio de unión del sustrato peptídico *35*
1.3.2.3.4. Flexibilidad conformacional: conformación abierta y cerrada *36*
1.3.2.4. Mecanismo de reacción 38
1.3.3. Subunidad reguladora –R ***39***
1.3.3.1. Isoformas 40
1.3.3.2. Clasificación 41
1.3.3.3. Estructura 43
1.3.3.3.1. Dominio D/A *45*
1.3.3.3.2. Región de unión flexible *46*
1.3.3.3.3. Dominios de unión de AMPc *47*
1.3.4. Holoenzima PKA – complejo $R_2$2C ***49***
1.3.4.1. Estructura complejo RC 49
1.3.4.2. Mecanismo de activación de la PKA por AMPc 53
1.3.5. Distribución subcelular de la PKA ***54***
1.4. El mejillón *Mytilus* como modelo experimental 57
1.4.1. Clasificación taxonómica del mejillón ***57***
1.4.2. El mejillón y su importancia en la economía de Galicia ***58***
1.4.3. Breve descripción anatómica, histológica y fisiológica del mejillón ***59***

1.4.3.1. La concha 59
1.4.3.2. El manto 59
1.4.3.3. La gónada 62
1.4.3.4. Los músculos aductores 63
1.4.3.5. Las branquias 64
1.4.3.6. Los palpos labiales 65
1.4.3.7. El aparato digestivo 67
1.4.3.8. El pie y el biso 69
1.4.3.9. El sistema circulatorio 70
1.4.3.10. El sistema excretor 71
1.4.3.11. El sistema nervioso – sensorial 71
1.4.4. El mejillón como modelo en investigación bioquímica ***72***
1.4.4.1. El mejillón como modelo de adaptación a hipoxia 73
1.4.4.2. Algunos músculos del mejillón como modelos de contracción«catch» 74
1.4.4.3. El mejillón como modelo biotecnológico 75

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS **77**

MATERIAL Y MÉTODOS **83**

3.1. Material 85
3.1.1. Material biológico ***85***
3.1.2. Productos químicos y bioquímicos ***85***
3.1.2.1. Reactivos inorgánicos 85
3.1.2.2. Productos bioquímicos 85
3.1.2.3. Péptidos y proteínas 86
3.1.2.4. Anticuerpos primarios y secundarios 86
3.1.2.5. Productos y columnas de cromatografía 86
3.1.2.6. Productos y material de electroforesis, isoelectroenfoque e Inmunotransferencia 87
3.1.2.7. Productos y material para inmunohistoquímica 87
3.1.2.8. Productos y material para inmunohistoquímica 88
3.1.2.9. Otro material 88
3.2. Métodos 88
3.2.1. Obtención de extractos de tejidos ***88***
3.2.1.1. Extractos para el análisis de la distribución tisular de R_{myt1} y R_{myt2} 88
3.2.1.2. Extracto para la determinación de actividad CK2 89
3.2.1.3. Extractos para la fosforilación de proteínas por isoformas desubunidad C 89

3.2.2. Purificación de proteínas ***90***
3.2.2.1. Purificación de $PKAm_{yt1}$ y PKA_{myt2} 90

3.2.2.2. Purificación de la subunidad C de la PKA 91
3.2.2.3. Separación de diferentes isoformas de la subunidad C de la PKA 92
3.2.2.4. Purificación de R_{myt1} y R_{myt2} 92
3.2.2.5. Purificación y reconstitución de otras proteínas 93
3.2.3. Determinación de la concentración de proteína 93
3.2.4. Métodos electroforéticos 94
3.2.4.1. SDS-PAGE 94
3.2.4.2. Determinación del peso molecular mediante SDS-PAGE 95
3.2.4.3. Isoelectroenfoque (IEF) 96
3.2.5. Inmunotransferencia o «Western blotting» 96
3.2.6. Medida de la actividad PKA 97
3.2.7. Fosforilación por CK2 98
3.2.7.1. Fosforilación de R_{myt1} y R_{myt2} por CK2 98
3.2.7.2. Estequiometria de fosforilación de R_{myt2} 99
3.2.7.3. Efecto de la fosforilación por CK2 sobre la actividad de R_{myt2} 100
3.2.7.4. Medida de actividad CK2 en extractos de mejillón 100
3.2.8. Análisis inmunohistoquímico 101
3.2.9. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas 102
3.2.9.1. Descripción general del procedimiento utilizado 102
3.2.9.2. Tratamiento y digestión de la proteína 103
3.2.9.3. Derivatización de los péptidos 104
3.2.9.4. Espectrometría de masas 105
3.2.10. Cálculos de constantes cinéticas y análisis estadístico 105

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 107

4.1. Determinación de la secuencia parcial de R_{myt2} 109
4.1.1. Resultados 109
4.1.2. Discusión 111
4.2. Caracterización de R_{myt1} y R_{myt2}: fosforilación por CK2 113
4.2.1. Resultados 113
4.2.1.1. Fosforilación de R_{myt2} por CK2 113
4.2.1.2. Estequiometría de fosforilación 114
4.2.1.3. Actividad CK2 en extactos de mejillón 115
4.2.1.4. Efecto de la fosforilación de R_{myt2} sobre su actividad biológica 116
4.2.2. Discusión 117

4.3. Distribución tisular de R_{myt1} y R_{myt2} 120
4.3.1. Resultados 120

4.3.2. Discusión *131*
4.4. Purificación y caracterización de PKA_{myt1} y PKA_{myt2} – activación por nucleótidos cíclicos 136
4.4.1. Resultados *136*
4.4.1.1. Purificación parcial de PKA_{myt1} y PKA_{myt2} 136
4.4.1.2. Activación de PKA_{myt1} y PKA_{myt2} por AMPc y CMPc 138
4.4.1.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad PKA_{myt1} yPKA_{myt2} 139
4.4.2. Discusión *140*
4.5. Identificación de diferentes isoformas de subunidad C de la PKA de *Mytilus* 144
4.5.1. Resultados *144*
4.5.1.1. Separación de diferentes isoformas de subunidad C mediante cromatografía de IC144
4.5.1.2. Determinación del peso molecular de las isoformas de subunidad C 147
4.5.1.3. Caracterización estructural de las isoformas de subunidad C mediante MS 148
4.5.1.4. Caracterización cinética de las isoformas de subunidad C 152
4.5.2. Discusión *155*
4.6. Identificación de una proteína presente en MAP que co-purifica con la subunidad C 159
4.6.1. Resultados *159*
4.6.2. Discusión *164*

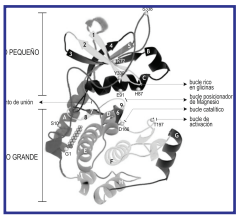
CONCLUSIONES **169**

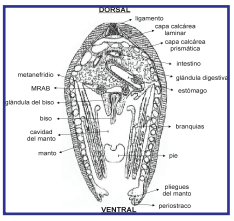
BIBLIOGRAFIA **173**

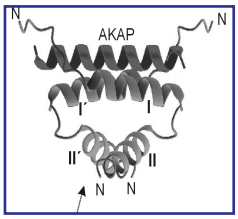
ANEXOS **217**

1 introducción









1. 1. Fosforilación de proteínas: breve historia

> *«Sería difícil encontrar a alguien actualmente que pueda estar en desacuerdo con la siguiente afirmación: la fosforilación reversible de proteínas regula casi todos los aspectos de la célula viva»* (Cohen, 2002).

La fosforilación reversible de proteínas, que ocurre tanto en procariotas como en eucariotas, constituye, sin duda, el más importante y generalizado **mecanismo de regulación de los procesos celulares** en respuesta a estímulos externos, y se estima que en torno al 30% de las aproximadamente 30.000 proteínas codificadas por el genoma humano son fosfoproteínas. Entre los procesos regulados a través de este mecanismo se incluyen el metabolismo, la replicación del ADN, la expresión génica, el transporte a través de membranas, la organización del citoesqueleto, la contracción muscular, el ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación celular o la respuesta inmune (revisiones recientes: Bardford, 1999; Cohen, 2002; Pawson y Scott, 2005). La simplicidad, flexibilidad y reversibilidad del proceso de fosforilación, unida a la rápida disponibilidad de ATP como principal donante del grupo fosfato en las células, seguramente son suficientes para explicar su selección como el mecanismo regulador más generalizado adoptado por las células eucariotas.

Los efectos fisiológicos de la fosforilación son consecuencia de los cambios conformacionales que la incorporación covalente de fosfato provoca en zonas más o menos localizadas de las proteínas fosforiladas. Estos cambios conformacionales pueden **modificar la función de las proteínas** en múltiples aspectos: alterando su actividad biológica, estabilizándolas, marcándolas para su destrucción, facilitando o inhibiendo su movimiento entre compartimentos celulares, iniciando/finalizando interacciones con otras proteínas, etc. (Jonhson y Barford, 1993; 1994; Johnson, 1994; Pawson y Scott, 1997; Scott y Pawson, 2000).

El **inicio del estudio de la fosforilación de proteínas se sitúa en el año 1954** cuando Eugene Kennedy describe una enzima presente en hígado, capaz de catalizar la fosforilación de la caseína (Burnet y Kenedy, 1954). Desde esa fecha hasta la actualidad, los avances en este campo han sido espectaculares, y debidos a partes iguales –como ocurre casi siempre en ciencia– a la perspicacia de los investigadores y a los descubrimientos casuales.

En los primeros años, el estudio de la fosforilación de proteínas estuvo muy ligado a la investigación sobre las bases bioquímicas a través de las cuales algunas hormonas –especialmente insulina, glucagón y adrenalina– regulaban el metabolismo del glucógeno. Esta investigación se llevó a cabo fundamentalmente en el laboratorio de Carl y Gerty Cori, en la Washington University

School of Medicine, St. Louis. En 1950, Earl Sutherland y colaboradores habían observado que la incubación de cortes hepáticos con adrenalina o glucagón estimulaba la glucogenolisis, como consecuencia de la activación de la glucógeno fosforilasa; poco después descubrieron que la adrenalina ejercía sus efectos a través de la formación de un «factor termoestable» de pequeño tamaño identificado como el nucleótido AMP cíclico o AMPc (Sutherland y Wosilait, 1955; revisión: Robinson *et al*., 1971). El AMPc resultó ser el primer «segundo mensajero» conocido.

Algunos años más tarde, en 1955, Edwing Krebs –que había trabajado junto a Sutherland en el laboratorio de los Cori– y Edmon Fischer descubrieron que la interconversión de la glucógeno fosforilasa *b* (inactiva) y la glucógeno fosforilasa *a* (activa) ocurría mediante un proceso de fosforilación/defosforilación; concretamente, demostraron que la forma *b* se podía convertir en la forma *a* en presencia de MgATP y de una enzima a la que denominaron **fosforilasa quinasa**. Usando ATP marcado, demostraron que el fosfato se incorporaba a un residuo de serina de la fosforilasa *b* , transformándola en fosforilasa *a* activa (Fischer y Krebs 1955; Krebs y Fischer, 1956; Fischer *et al*., 1959; Krebs, 1993; Fischer, 1993). Las piezas del rompecabezas comenzaron a encajar cuando, en 1968, Krebs y colaboradores descubrieron que el AMPc activaba una proteína quinasa, a la que llamaron «cAMP-dependent phosphorylase kinase» –actualmente proteína quinasa dependiente de AMPc o PKA– la cual fosforilaba la fosforilasa quinasa, responsable, a su vez, de la activación de la glucógeno fosforilasa (Walsh *et al*., 1968). Fue éste el primer ejemplo de una «cascada» en la que unas proteína quinasas son activadas por la acción de otras. Los tres investigadores clave de este período: Sutherland, y Fischer y Krebs, recibieron el premio Nobel por sus descubrimientos, en los años 1971 y 1992, respectivamente.

A pesar de estos avances, a finales de la década de 1960 –quince años después del descubrimiento de la fosforilasa quinasa– todavía se creía que la fosforilación de proteínas era un mecanismo de regulación específico y restringido al metabolismo del glucógeno; y fue **en la década de 1970 y los primeros años de la década de 1980 cuando se apreció el verdadero significado de la fosforilación de proteínas** como un mecanismo general de regulación. Durante este período se descubrieron proteínas no enzimáticas que también eran fosforiladas (England, 1975; Tada *et al*., 1975), y se identificaron nuevas proteína quinasas, entre ellas la proteína quinasa C (Takai *et al*., 1977), la proteína quinasa dependiente de calmodulina (Schulman y Greengard, 1978) o la quinasa de la cadena ligera de la miosina (Dabrowska *et al*., 1978). Además, entre 1970 y 1980 se descifraron los mecanismos de regulación de algunas proteína quinasas (Kishimoto *et al*., 1980) lo que amplió el concepto de «proteína quinasas dependientes de segundos mensajeros», hasta entonces restringido a la PKA. También se descubrieron en este período los primeros ejemplos de proteínas que son fosforiladas en varios aminoácidos por una o más quinasas –proceso conocido

como **fosforilación multisitio–** (Cohen, 1976), y que actualmente se sabe que son la mayoría (Cohen, 2000).

El descubrimiento, en el año 1975, de que la PKA podía fosforilar péptidos procedentes de la digestión tríptica de la mielina (Dayle *et al*., 1975) llevó a la conclusión de que las proteína quinasas fosforilaban residuos situados en secuencias aminoacídicas específicas (Kemp *et al*., 1976). Este hallazgo conllevó el **desarrollo de péptidos sintéticos** que pueden actuar como sustratos o inhibidores de proteína quinasas, y que constituyen una herramienta clave en el estudio de estas enzimas.

Otro descubrimiento importante de principios de la década de 1980 fue la determinación de **la primera secuencia aminoacídica** completa **de una proteína quinasa**: la PKA (Shoji *et al*., 1981), puesto que permitió identificar los productos de algunos genes secuenciados en esa época como proteína quinasas. Un año más tarde, en 1981, Philip Cohen y colaboradores caracterizaron la proteína fosfatasa 2B dependiente de calmodulina, o calcineurina (Stewart *et al*., 1982), diana de la ciclosporina, el inmunosupresor que hizo posible el transplante de órganos (Liu *et al*., 1991).

Durante la década de los 80 también se descubrió que las proteína quinasas y las proteína fosfatasas no siempre encuentran sus sustratos por simple difusión sino que, frecuentemente, se hallan confinadas en determinadas estructuras u orgánulos celulares, mediante la **interacción específica con proteínas de anclaje**. El ejemplo más llamativo de estas interacciones proteína-proteína lo constituyen las llamadas AKAPs («*A k*inase *a*nchor *p*roteins»), un grupo cada vez más amplio de proteínas que anclan la PKA a determinadas estructuras celulares mediante la interacción con su subunidad reguladora, y le confieren, de esta forma, especificidad espacial (revisión: Langeberg y Scott, 2005).

La **década de los 90** es apodada por algunos autores como la década de las **«cascadas de proteína quinasas»**. Resulta hasta cierto punto sorprendente que, a pesar de que la primera cascada de activación de proteína quinasas fue descubierta en 1968, debieran transcurrir más de 20 años antes de identificar otros ejemplos de este fenómeno. A finales de los años 80 se identificó una proteína quinasa que fosforilaba la proteína 2 asociada a microtúbulos, MAP-2 (Ray y Sturgill, 1987) y que era activada por mitógenos y factores de crecimiento en numerosas células –de ahí su nombre «*m*itogen-*a*ctivated *p*rotein kinase» o MAP quinasa. Esta enzima resultó ser activada en residuos de treonina y de tirosina por una proteína quinasa con especificidad dual: la MAP quinasa quinasa (Gómez y Cohen, 1991). Todos los elementos de esta cascada de las MAP quinasas, actualmente una de las mejor conocidas, fueron identificados en los primeros años de la década de 1990, gracias al esfuerzo de numerosos laboratorios. En estos años también se identificó la cascada de la proteína quinasa dependiente de fosfatidil inositol trifosfato (PIP3), implicada en

las respuestas celulares a la acción de la insulina y factores de crecimiento (Franke *et al*., 1995; Toker y Cantley, 1997), y que culminó con el descubrimiento de proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítido, en 1997 (Alessi *et al*., 1997).

En el año 1991, el grupo de Susan Taylor, en la Universidad de California, determinó la **estructura tridimensional**, mediante difracción de rayos X, de una proteína quinasa: **la subunidad catalítica de la PKA** (Knighton *et al*., 1991a; 1991b). Este descubrimiento fue clave, puesto que proporcionó un marco estructural para los diferentes subdominios de la secuencia de las proteína quinasas, identificados previamente por el grupo de Tony Hunter (Hanks y Hunter, 1988).

Otra línea de capital importancia en el estudio de la fosforilación de proteínas es la que se refiere a **las tirosina quinasas**. La historia de este grupo de enzimas, que fosforilan específicamente residuos de tirosina, comienza en 1979, año en el que Tony Hunter y colaboradores descubrieron que la proteína v-src, producto del oncogen *v-src* (virus del sarcoma de Rous), fosforilaba residuos de tirosina en proteínas (Hunter y Sefton, 1980). Casi al mismo tiempo se descubrieron otras dos tirosina quinasas: el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Ushiro y Cohen, 1980) y el receptor de la insulina (Kasuga *et al*., 1982). Otro hallazgo sorprendente fue el descubrimiento de que los receptores con actividad tirosina quinasa tienen la **capacidad de autofosforilarse en numerosos residuos de tirosina** lo que les confiere la capacidad de unir proteínas citoplasmáticas que contienen los denominados dominios «*S*rc *h*omology *2*» (SH2), y que reconocen específicamente secuencias ricas en fosfotirosinas (Sadowski *et al*., 1986; Anderson *et al*., 1990). La unión de estas dianas citoplasmáticas con dominios SH2 a los receptores tirosina quinasa inicia la activación de cascadas intracelulares que regulan numerosos procesos, en respuesta a señales extracelulares.

A finales de 1980 y principios de 1990 se descubre una nueva familia de tirosina quinasas, las denominadas JAK quinasas («*j*ust *a*nother *k*inase» o «*J*anus *k*inase»– en honor al dios romano con dos caras), implicadas en la regulación del proceso de transcripción (Wilks *et al*., 1991). Estas enzimas se activan en la membrana plasmática, como respuesta a la interacción de citoquinas con sus receptores, y fosforilan unos factores de transcripción conocidos como STATs («*s*ignal *t*ransducers and *a*ctivators of *t*ranscription») que, una vez fosforilados, migran al núcleo y regulan directamente el proceso de transcripción (revisión: Wilks y Harpur, 1994). El descubrimiento de este mecanismo de regulación directa a través de unas proteínas que migran desde la membrana plasmática al núcleo también resultó, en su momento, sorprendente.

En los últimos años se ha resuelto la estructura tridimensional de numerosas proteína quinasas; los datos obtenidos revelan que todos los miembros de esta familia de enzimas comparten elementos estructurales comunes en su dominio catalítico, y permiten comprender la

especificidad de sustrato y la discriminación entre grupos hidroxilo alifáticos (serina/treonina) y aromáticos (tirosina). Al mismo tiempo, se han obtenido grandes avances en el **esclarecimiento de diferentes vías de señalización**, así como en la relación entre fallos genéticos a nivel de determinadas proteína quinasas y algunas enfermedades como el cáncer.

En definitiva, el conocimiento acumulado acerca de la fosforilación de proteínas ha alcanzado un nivel suficiente para reconocer la importancia de este mecanismo en la regulación de la mayoría de los procesos celulares. A pesar de ello, en opinión de los expertos, quedan probablemente muchas sorpresas todavía ocultas, y tal vez el conocimiento acerca de la fosforilación de proteínas esté todavía en un período inicial. Los **principales retos** que se plantean en los próximos años son probablemente los siguientes:

- Identificar los sustratos fisiológicos de todas las proteína quinasas y analizar cómo su fosforilación contribuye a los cambios fisiológicos en respuesta a señales extracelulares.
- Definir el contexto temporal y espacial de los procesos de fosforilación.
- Descubrir la posible importancia de proteína quinasas que fosforilan aminoácidos lisina e histidina.
- Determinar la importancia de las llamadas fosforilaciones silenciosas y de las fosforilaciones múltiples, en combinación con otras modificaciones post-traduccionales.
- Desarrollar inhibidores específicos de proteína quinasas y proteína fosfatasas para usar como posibles agentes terapéuticos.

> «*Hemos recorrido un largo camino en los últimos 50 años, pero estamos justo empezando a entender la intersección entre la fosforilación de proteínas y la biología celular. Es difícil imaginar donde estaremos en 2055, un siglo después del descubrimiento de la fosforilación de proteínas, pero planeamos estar cerca del final*» (Pawson y Scott, 2005).

1.2. Proteína quinasas

1.2.1. CLASIFICACIÓN

En el proceso de fosforilación reversible de proteínas en las células eucariotas están implicadas dos tipos de enzimas: las **proteína quinasas** y las **proteína fosfatasas**. Ambos grupos de enzimas constituyen, en palabras de Tony Hunter –uno de los investigadores que ha contribuido en mayor medida al conocimiento de estas enzimas– el yin y el yang de este mecanismo de regulación (Hunter, 1995). Las primeras catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde un nucleósido trifosfato, normalmente adenosina trifosfato (ATP), al grupo hidroxilo de un aminoácido de la proteína sustrato, generando la formación de un enlace fosfoéster. En sentido contrario, las proteína fosfatasas catalizan la hidrólisis de un enlace fosfoéster en una proteína, liberando el fosfato inorgánico, y haciendo reversibles por tanto los efectos de la fosforilación; aunque no son objeto de este trabajo, citamos a continuación algunas excelentes revisiones sobre esta familia cada vez más numerosa e importante de enzimas: Cohen, 1989; Vincent *et al*., 1992; Shenolikar, 1994; Barford, 1996; Fauman y Saper, 1996; Tonks, 2006; Mustelin, 2006.

En este capítulo nos centraremos en las proteína quinasas, que constituyen una de las superfamilias de proteínas más numerosa. La **primera proteína quinasa** fue identificada y purificada por el grupo de Edwing Krebs en el año 1956, a partir de músculo de conejo. Se trata de la **fosforilasa quinasa**, responsable de la conversión de la glucógeno fosforilasa *b* en glucógeno fosforilasa *a* (Krebs y Fischer, 1956). Desde esa fecha hasta la actualidad el número de proteína quinasas identificadas se ha ido incrementando de forma exponencial, especialmente a partir de mediados de los años 70, gracias, sobre todo, al desarrollo de las técnicas de secuenciación del ADN. Los últimos años, el descifrado de los genomas de varias especies ha permitido identificar el conjunto completo de genes que codifican para proteína quinasas, conocido con el término «quinoma». El **quinoma humano**, por ejemplo, **está constituido por 518 genes** (Manning *et al*., 2002a), la mitad del número que se predijo hace veinte años (Hunter, 1987), pero que aún así constituye aproximadamente el 1,7 % del genoma. Además del quinoma humano se han descifrado los correspondientes a otras especies de mamíferos, invertebrados y eucariotas unicelulares, cuyos genomas han sido también secuenciados. Concretamente, son conocidos los quinomas de ratón (540 genes) (Caenepeel *et al*., 2004), *Drosophila melonogaster* (239 genes) (Manning *et al*., 2002b), *Caenorhabditis elegans* (438 genes) (Manning, 2005) , erizo de mar (353 genes) (Bradham *et al*., 2006), *Saccharomyces cerevisiae* (130 genes), (Manning *et al*., 2002b), *Dictyostelium* (285 genes) (Goldberg *et al*., 2006) y *Tetrahymena thermophila* (Eisen *et al*., 2006). En general, el número de

genes que codifican proteína quinasas en las diferentes especies estudiadas representa entre el 1,5 y el 2,5 % de su genoma.

El número de proteína quinasas conocidas actualmente es muy elevado. Existen bases de datos que contienen más de 16.000 entradas de secuencias correspondientes a estas enzimas pertenecientes a muchas especies (Niedner *et al*., 2006). Un buen número de ellas, sin embargo, no han sido purificadas ni caracterizadas bioquímicamente, ni se conocen sus sustratos fisiológicos ni su función. Los criterios de clasificación de los miembros de esta superfamilia de enzimas se han ido modificando con el tiempo. En un principio se establecieron **dos grandes grupos de proteína quinasas**, en función del aminoácidos aceptor del grupo fosfato: en uno se incluían aquéllas que fosforilan proteínas en residuos de serina o treonina (**serina/treonina quinasas**, EC 2.7.11) mientras que el otro englobaba aquellas enzimas que transfieren el grupo fosfato al grupo fenólico del aminoácido tirosina (**tirosina quinasas**, EC. 2.7.10) (Hunter, 1991). Aunque la mayoría de las proteína quinasas fosforilan de forma específica hidroxilos alifáticos o aromáticos, actualmente se sabe que algunas de ellas poseen especificidad dual dado que son capaces de fosforilar *in vivo*, tanto residuos de serina/treonina como de tirosina (EC 2.7.12 (Lindberg *et al*., 1992; Marshall, 1994; Dhanasekaran y Premkumar, 1998).

La gran avalancha de nuevas proteína quinasas identificadas, que tuvo lugar especialmente a partir de 1980, conllevó la necesidad de utilizar **nuevos criterios para su clasificación**, basados en el **grado de homología de determinadas regiones de sus secuencias**. A pesar de que entre los miembros de la superfamilia de las proteína quinasas existe una gran diversidad de funciones, formas de regulación y especificidad de sustrato, la comparación de sus secuencias aminoacídicas permitió deducir que todas ellas comparten el denominado **«dominio catalítico»**, una región de aproximadamente 250-300 aminoácidos agrupados en doce subdominios que se pliegan adoptando una estructura terciaria característica (Hanks *et al*., 1988; Hanks y Quinn, 1991). Dentro de este dominio catalítico se encuentran aminoácidos invariables o muy conservados en todas las proteína quinasas, que están implicados en la unión y correcta orientación de los sustratos, así como en la transferencia del grupo fosfato γ del ATP al hidroxilo del aminoácido aceptor en la proteína sustrato. En base al alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a los dominios catalíticos, Hunter y colaboradores establecieron una primera clasificación de la superfamilia de las proteína quinasas en cinco grupos, 44 familias y 51 subfamilias, las cuales contienen enzimas estructuralmente muy relacionadas entre sí. Los miembros de cada una de las subfamilias, generadas por parentescos estructurales, poseen habitualmente propiedades funcionales también muy similares (Hanks y Hunter , 1995).

El descifrado de los quinomas de algunas especies, citadas anteriormente, y la consecuente identificación de nuevas proteína quinasas hasta ese momento desconocidas, conllevó la necesidad de ampliar el número de grupos propuestos inicialmente en la clasificación de Hanks y Hunter. Por ello Manning y colaboradores establecieron una nueva clasificación de las proteína quinasas que constituyen el quinoma humano (Manning *et al*., 2002a), y también el de otras especies (Manning *et al*., 2002b; Manning, 2005), basada fundamentalmente en la comparación de las secuencias de los dominios catalíticos, pero teniendo en cuenta también otros parámetros, como la similitud de secuencias en otros dominios distintos al catalítico o la función biológica desempeñada. Esta clasificación de las proteína quinasas se muestra en la tabla 1.1 y en la figura 1.1 la cual contiene una representación del árbol filogenético o dendrograma correspondiente al quinoma humano, en el que se puede observar fácilmente el grado de parentesco/divergencia entre los diferentes miembros de esta superfamilia de enzimas.

Tabla 1.1 Clasificación de las proteína quinasas del quinoma humano

Grupo [1]	*Nº familias*	*Nº subfamilias*	*Nº proteína quinasas*
AGC	14	21	63
CAMK	17	33	74
CK1	3	5	12
CMGC	8	24	61
STE	3	13	47
TK	30	30	90
TKL	7	13	43
RGC	1	1	5
Otras	37	39	83
aPK	14	22	40
Total	**134**	**201**	**518**

[1] **AGC**: contiene las familias PKA, PKG y PKC; **CAMK**: «Ca^{2+}-calmodulin-dependent protein kinase»; **CKI**: «*c*asein *k*inase I»; **CMGC**: contiene las familias CDK («*c*yclin-*d*ependent protein *k*inase), MAK («*m*itogen-*a*ctivated protein *k*inase»), GSK3 («*g*lycogen *s*ynthase *k*inase *3*») y CLK («*c*dc2-*l*ike protein *k*inase»); **STE**: «*st*erile *k*inase»; **TK**: «*t*irosin *k*inase»; **TKL**: «*t*irosin *k*inase *l*ike»; **RGC**: «*r*eceptor *g*uanilate *c*yclase»; **aPK**: «*a*typical *p*rotein *k*inase».

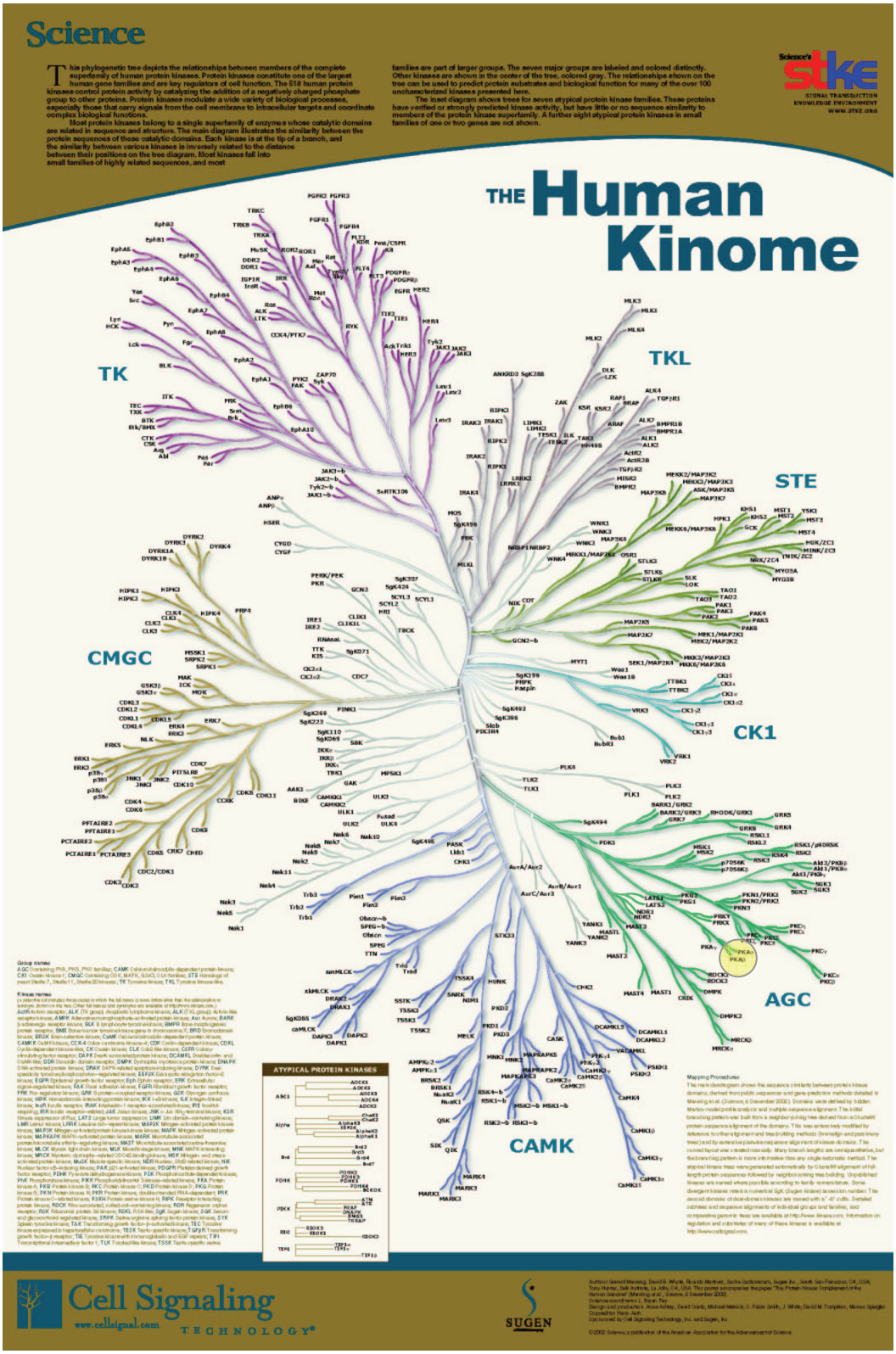


Figura 1.1. Dendrograma del quinoma humano mostrando los diferentes grupos, familias y subfamilias de proteína quinasas. Imagen obtenida del «póster del quinoma humano» de Cell Signalling Technology® (http://www.cellsignal.com) procedente, a su vez, del trabajo original de Manning *et al*. 2002a. Se señala con un círculo la posición que ocupa en el dendrograma la proteína quinasa dependiente de AMPc.

Como se muestra en la tabla 1.1, de las 518 proteína quinasas codificadas por el genoma humano, 40 corresponden a proteínas que, aunque poseen actividad enzimática proteína quinasa, su secuencia carece de similitud con la secuencia del dominio catalítico típico de las proteína quinasas, y por eso se denominan **proteína quinasas atípicas** (aPK). La 478 restantes constituyen la superfamilia de las denominadas **proteína quinasas eucarióticas o típicas (ePK), que se divide**, a su vez, **en 9 grupos, 120 familias y 179 subfamilias.**

La comparación de los quinomas de diferentes organismos, distanciados evolutivamente, y la observación del número de subfamilias compartidas por varias especies permite extraer conclusiones interesantes. Como se muestra en la figura 1.2, existen 53 subfamilias presentes en los quinomas de hombre, gusano, mosca y levadura, lo cual parece lógico teniendo en cuenta que las proteína quinasas regulan una gran variedad de procesos celulares básicos, presentes, por tanto, en todos los organismos. Otras 91 subfamilias son compartidas por hombre, gusano y mosca (metazoos), pero están ausentes en levadura. Entre estas 91 subfamilias se encuentran las pertenecientes al grupo tirosina quinasas (TK) y «*t*irosin *k*inases *l*ike» (TKL), reguladoras de los procesos de comunicación intercelular más complejos. Otra observación interesante es que el hombre y la mosca comparten bastantes subfamilias de proteína quinasas implicadas en la inmunidad, neurobiología y morfogénesis que están ausentes en el gusano, lo que sugiere que estas funciones surgieron después de la divergencia de los nematodos de la línea principal de los metazoos.

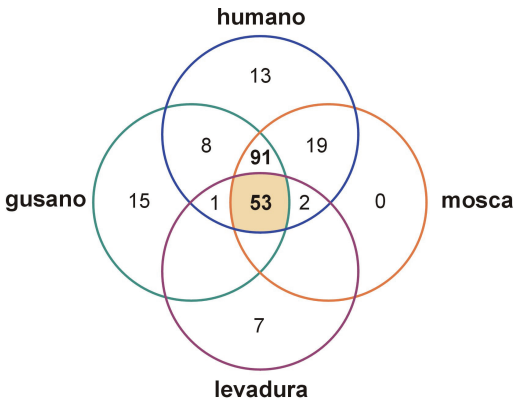


Figura 1.2. Distribución de las subfamilias de proteína quinasas entre especies (adaptado de Manning, 2005)

1.2.2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD

La **actividad enzimática de las proteína quinasas está sometida a un estricto control**. En general, en las células no cancerosas, las proteína quinasas se encuentran en un estado o conformación inactiva, hasta que en un determinado momento, y de forma transitoria, adquieren una

conformación activa, que desencadena, a través de la fosforilación de determinadas proteínas sustrato, una respuesta fisiológica.

La **activación** de las proteína quinasas tiene lugar mediante diversos **mecanismos** que implican: (*i*) unión de moléculas efectoras (sustratos o ligandos); *(ii*) fosforilación por si mismas (autofosforilación) o por otras proteína quinasas; y (*iii*) interacciones proteína-proteína o interacciones entre dos dominios diferentes de la misma proteína (revisiones: Johnson *et al*., 1996; Huse y Kuriyan, 2002; Shi *et al*., 2006; Gold *et al*., 2006; Pellicena y Kuriyan, 2006; Taylor y Ghosh, 2006).

Actualmente, con la información obtenida de la comparación de secuencias y la determinación de su estructura tridimensional, se considera a las proteína quinasas como estructuras modulares. El módulo compartido por todas ellas es el dominio catalítico, que contiene un conjunto de aminoácidos invariables o muy conservados, la mayoría de los cuales están implicados en la unión de ATP y en el proceso de catálisis. Otros módulos, específicos de cada proteína quinasa, o compartidos solamente por los miembros de una familia o subfamilia, confieren características específicas a cada proteína quinasa en cuanto a la regulación de su actividad. Estos módulos tienen una longitud variable y se sitúan normalmente en los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína, flanqueando el dominio catalítico, aunque, excepcionalmente, pueden encontrarse en una cadena peptídica diferente. Este es el caso de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) en la cual la subunidad catalítica y la subunidad reguladora que la mantiene en estado inactivo son proteínas diferentes.

1.2.3. BASES DE DATOS Y RECURSOS «ON-LINE» DE INTERÉS EN EL ESTUDIO DE PROTEÍNA QUINASAS

La cantidad de información disponible actualmente sobre proteína quinasas es enorme y se incrementa día a día. Por este motivo finalizamos este apartado dedicado a las proteína quinasas, indicando algunos recursos «on-line», de acceso gratuito, que hemos seleccionado porque contienen información relevante, contrastada y actualizada sobre esta familia de enzimas, o bien porque contienen herramientas que consideramos de gran utilidad en la investigación sobre fosforilación de proteínas.

1) Protein Kinase Resource (PKR), Universidad de California, San Diego, USA
http://www.kinasenet.org

Se trata de un servicio «on-line» que permite el acceso, de forma gratuita, a información relevante relacionada con la señalización celular, y particularmente de la superfamilia de las proteína

quinasas. Se creó en el año 1996 por el grupo de Susan Taylor (Smith *et al*., 1997), y la nueva versión en al año 2005 (Niedner *et al*., 2006).

PKR contiene la base de datos más completa sobre proteína quinasas. Actualmente contiene más de 16.000 entradas de proteína quinasas de diferentes especies, muchas de las cuales, lógicamente, son proteínas ortólogas. Se actualiza regularmente de forma automática, ya que incorpora directamente de otras bases de datos, como UniProtKB (The Uniprot Consortium, 2007), aquellas secuencias que contienen el dominio catalítico de proteína quinasas, y las clasifica. De la misma manera, se halla sincronizada con la base de datos PDB (Protein Data Bank) de donde capta nuevas estructuras 3D correspondientes a proteína quinasas.

PKR además brinda una información integral de las proteína quinasas y dispone de herramientas que permiten, entre otras cosas, el alineamiento múltiple de secuencias, la búsqueda de proteína quinasas homólogas en diferentes especies, la visión y comparación de estructuras 3D o la situación de una determinada secuencia en el árbol filogenético del quinoma.

2) Kinase.com , Salk Institute, USA
http://kinase.com

Página web con información valiosa sobre las funciones, evolución y diversidad de las proteína quinasas. Centrada fundamentalmente en el quinoma de aquellas especies cuyo genoma ha sido secuenciado. Contiene una base de datos denominada «KinBase» con información sobre las proteína quinasas que constituyen el quinoma humano y el de otras especies como ratón, erizo de mar, *Drosophila*, *Caenorhabditis*, *Saccharomyces*, *Dyctiostelium* y *Tetrahymena thermophila*, y dispone de herramientas para analizar la evolución de las proteína quinasas en los eucariotas y visualizar árboles filogenéticos.

3) Phospho.ELM, EMBL, European Molecular Biology Laboratory
http://phospho.elm.eu.org

Base de datos de sitios de fosforilación –comprobados experimentalmente– de serina/treonina y tirosina quinasas en proteínas de eucariotas. La última actualización (diciembre 2006) contiene 3675 entradas de proteínas de diferentes especies, sustratos de proteína quinasas. Permite la búsqueda de sitios de fosforilación en una proteína concreta, o la búsqueda de todos los sustratos conocidos de una determinada proteína quinasa (Diella *et al*., 2004).

4) PhosphoSite® KnowledgeBase, Cell Signalling Technology®
http://phosphosite.org

Base de datos de fosfoproteínas en las que se demostró experimentalmente que la fosforilación ocurre *in vivo*.

5) Protein kinase Substrate Prediction «PREDIKIN», Universidad de Queensland
http://florey.biosci.uq.edu.au/kinsub/home.htm

Programa informático «PREDIKIN» que permite predecir, de forma automática, qué péptidos o proteínas son sustratos óptimos de una determinada serina/treonina quinasa, a partir de la secuencia del dominio catalítico de la misma (Brinkworth *et al*., 2003).

6a) NetPhosk 1.0. Server, Center for Biological Sequence Analysis (CBS), Technical University of Denmark
http://cbs.dtu.dk/services/NetPhosk

6b) KinasePhos, Department of Life Science, National Central University , Taiwan
http://KinasePhos.mbc.nctu.edu.tw

Servicios «on-line» que permiten predecir sitios de fosforilación de las proteína quinasas más conocidas –entre ellas PKA, PKG, PKC, CK2, MAPK etc.– en proteínas de eucariotas. Simplemente es necesario introducir la secuencia de la proteína, en formato FASTA, y el programa identifica el/los aminoácidos que teóricamente podrían ser fosforilados por una determinada proteína quinasa (Blom *et al*., 2004; Huang *et al*., 2005).

7) Scansitev2.0, Massachusetts Institute of Tecnology, MIT)
http://scansite.mit.edu

Servicio «on-line» para realizar la búsqueda de motivos estructurales en proteínas que pueden ser fosforilados por serina/treonina o tirosina quinasas específicas y también de motivos estructurales de unión a dominios SH2, PDZ o 14-3-3 (Obenauer, 2003).

1.3. Proteína quinasa dependiente de AMPc

La proteína quinasa dependiente de AMPc (proteína quinasa A; PKA; cAPK; E.C. 2.7.11.11) es un miembro del grupo AGC en la actual clasificación de las proteína quinasas. Fue **descubierta por el grupo de Edwing Krebs en el año 1968**, durante su investigación sobre la regulación de la glucógeno fosforilasa (Walsh *et al*., 1968). En un principio se denominó «cyclic AMP-dependent phosphorylase kinase» pero pronto se comprobó que su especificidad era más amplia de lo que indicaba este nombre ya que, además de la fosforilasa quinasa, podía fosforilar otros sustratos fisiológicos.

La PKA constituye el **principal mediador de los efectos del AMPc en las células eucariotas** en respuesta a señales extracelulares, y se ha demostrado su participación en la regulación de procesos celulares tales como el metabolismo, la replicación, la expresión génica, el crecimiento, división y diferenciación celular, la organización del citoesqueleto, la motilidad de espermatozoides o la conductividad de canales iónicos (Hansson *et al*., 2000; Taskén y Aandahl, 2004). Se trata probablemente de la proteína quinasa más estudiada y mejor conocida, no sólo por su temprano descubrimiento, sino también por su simplicidad estructural y funcional, hecho que la ha convertido, a menudo, en modelo para el estudio de otras proteína quinasas. La enorme cantidad de información que existe sobre esta enzima, en sus múltiples aspectos, ha sido recogida en numerosas y excelentes revisiones bibliográficas. A continuación citamos solamente algunas de ellas, que consideramos más relevantes: Taylor *et al*., 1990; Francis y Corbin, 1994; Skalhegg y Taskén, 1997; Taylor *et al*., 2004.

1.3.1. ESTRUCTURA GENERAL Y ESPECIFICIDAD

La PKA constituye un ejemplo de proteína quinasa poco común en cuanto a su mecanismo de activación, dado que la parte reguladora y la parte catalítica se encuentran localizadas en cadenas polipeptídicas diferentes. En su **estado inactivo**, la PKA es un tetrámero formado por un dímero de subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C); posee por tanto **una estructura $R_2$2C**. El aumento transitorio de AMPc en la célula –como consecuencia de la activación de la adenilato ciclasa, en respuesta a una señal extracelular– y su unión a las subunidades R, promueve la disociación de la holoenzima en **un dímero R_2 y dos subunidades C** monoméricas que, una vez libres, pueden fosforilar un amplio espectro de proteínas celulares (figura 1.3).

Aunque la mayoría de las proteínas fosforiladas por PKA son citoplasmáticas, la subunidad C, una vez disociada, puede migrar por difusión al núcleo. Una de sus principales dianas en este

compartimento celular son una familia de proteínas denominadas CREB («*c*AMP-*r*esponse *e*lement *b*inding-protein») que actúan como factores de transcripción, uniéndose a los llamados CREs («*c*AMP *r*esponse *e*lements»), localizados en las regiones promotoras de ciertos genes. La fosforilación de estas proteínas CREB por la subunidad C facilita su interacción con CREs y, en consecuencia, activa la transcripción de determinados genes en respuesta a estímulos extracelulares (revisiones: Shaywitz y Greenberg, 1999; Johannessen y Moens, 2007).

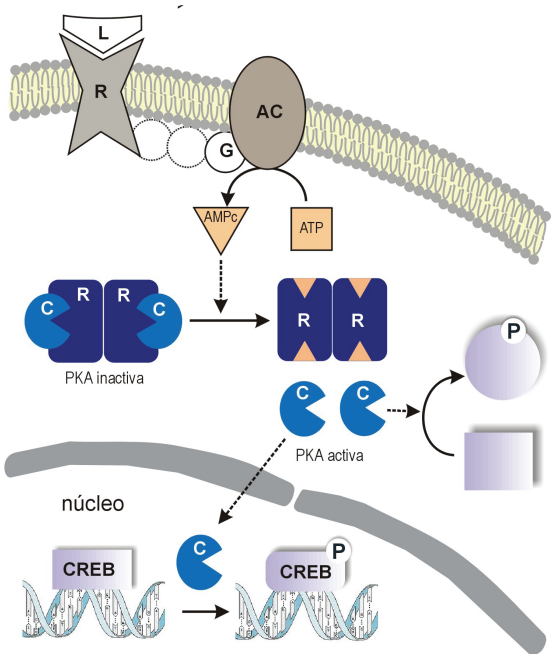


Figura 1.3. Esquema general de activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA). L, señal extracelular; R, receptor de membrana; G, proteína G; AC, adenilato ciclasa; R, subunidad reguladora; C, subunidad catalítica; CREB, «*c*AMP-*r*esponse element *b*inding protein».

Una vez dentro del núcleo, la subunidad C se une también a la proteína inhibidora PKI («*p*rotein *k*inase A *i*nhibitor») (Walsh *et al.*, 1971; Scott *et al.*, 1985), que inhibe su actividad ocupando su centro activo. Además, la unión a la subunidad C provoca en el PKI un cambio conformacional que descubre en su estructura una señal de exportación nuclear (NES) (Fantozzi *et al.*, 1994; Wen *et al.*, 1994; 1995); de esta manera, el complejo C–PKI regresa de nuevo al citoplasma evitando que la fosforilación de proteínas nucleares permanezca en el tiempo.

A pesar de la gran diversidad estructural y funcional que existe entre **las proteínas fosforiladas por PKA**, la mayor parte de ellas **tienen en común algunos elementos estructurales** que determinan la especificidad de sustrato de esta proteína quinasa. Inicialmente, el análisis de la secuencia en torno al sitio de fosforilación permitió identificar los aminoácidos que actúan como determinantes de especificidad, y que constituyen la denominada **«secuencia consenso»** de los sustratos de la PKA. Esta secuencia consenso es la siguiente: **Arg-Arg-X-Ser^{P}/Thr^{P}-X**, donde «X» representa cualquier aminoácido (Zetterqvist *et a*l., 1990; Pearson y Kemp, 1991). El diseño de péptidos sintéticos con variaciones en esta secuencia, y su utilización como sustratos de la PKA,

además de confirmar la importancia de los dos residuos de arginina en las posiciones -2 y -3 –la posición 0 corresponde al aminoácido fosforilado– reveló que la presencia de un residuo hidrofóbico, leucina o isoleucina, en la posición +1 es un determinante positivo, y también que la treonina es peor aceptor de fosfato que la serina (Kemp y Pearson, 1991; Tegge *et al*., 1995; Pinna y Ruzzene, 1996).

Recientemente, la determinación precisa de las interacciones entre la PKA y sus sustratos peptídicos, a partir de la resolución de la estructura tridimensional de la subunidad C con un péptido unido a su centro activo, permitió explicar la importancia de los aminoácidos de la secuencia consenso para el reconocimiento específico de los sustratos por parte de la PKA (Knighton *et al*., 1991a; 1991b; Kemp *et al*., 1994).

El número cada vez mayor de sitios de fosforilación identificados, incluidos en bases de datos, permite llevar a cabo análisis estadísticos, cada vez más precisos, de la distribución de aminoácidos en torno al residuo fosforilado. Los resultados de estos análisis se muestran en gráficos, denominados **«logos de secuencia»**, en los que la altura de la letra correspondiente a cada aminoácido indica la frecuencia relativa de ese aminoácido en una determinada posición de la secuencia (Kreegipuu *et al*., 1998). El logo de secuencia correspondiente a la PKA se muestra en la figura 1.4. Como se observa, los determinantes de especificidad situados en las posiciones -2 y -3 son menos estrictos de lo que indica la secuencia consenso, dado que existen proteínas fosforiladas por PKA que carecen de arginina en la posición -2, o en la posición -3, o en ambas.

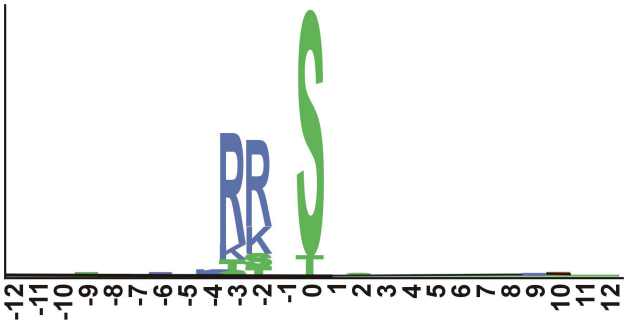


Figura 1.4. Logo de secuencia para la PKA, realizado a partir de los sitios de fosforilación identificados en 90 proteínas susutrato. En color azul se muestran aminoácidos básicos; en color verde aminoácidos polares (adaptado de Kreegipuu *et al*., 1998)

Actualmente se conocen las secuencias en torno al sitio de fosforilación de aproximadamente 200 proteínas fosforiladas por PKA, que se recogen en la base de datos como «Phospho.ELM» (ver apartado 1.2.3). Su análisis permite concluir que, aunque la mayoría de estas secuencias se aproximan a la secuencia consenso definida anteriormente, algunas difieren notablemente de la misma. Una posible explicación a este hecho es que, además de la secuencia consenso, las proteínas sustrato de la PKA poseen otros determinantes de especificidad, denominados «sitios de alta afinidad», que son responsables de la elevada afinidad con que la enzima une estos sustratos

proteicos en comparación con los péptidos sintéticos (Taylor *et al*., 1993; Kim *et al*., 2006). Por otra parte, es muy posible que, *in vivo,* la especificidad de sustrato de la PKA –y de las proteína quinasas en general– dependa, no sólo de la secuencia aminoacídica de la proteína sustrato, sino también de la disposición de éstos en la estructura secundaria y terciaria, que determinan la accesibilidad a los sitios de fosforilación. En conclusión, los datos más recientes parecen indicar que, para el reconocimiento de sustratos por la PKA, la secuencia consenso es un factor menos determinante en proteínas sustrato que en los péptidos sintéticos de pequeño tamaño utilizados como sustratos *in vitro* (Kreegipuu *et al*., 1998; Loog *et al*., 2005).

De los datos anteriores puede deducirse que la PKA –al igual que muchas otras proteína quinasas– posee múltiples sustratos potenciales ya que puede fosforilar *in vitro*, con gran efectividad, un gran número de proteínas celulares. Teóricamente, esta amplia especificidad de sustrato posibilitaría respuestas fisiológicas incontroladas ante una determinada señal extracelular. Dado que esto no ocurre, se planteó la necesidad de que existan mecanismos reguladores adicionales que restrinjan las acciones de la PKA *in vivo*, asegurando la fosforilación de proteínas sólo en el lugar celular y en el momento precisos. Uno de estos mecanismos consiste en la **compartimentalización celular de la PKA**, a través de **la interacción con proteínas específicas**, **que la mantienen localizada en determinadas estructuras celulares**, cerca de sus sustratos. De esta manera la PKA puede fosforilar específicamente proteínas en un determinado espacio subcelular, en respuesta a incrementos locales y transitorios de AMPc (revisión: Wong y Scott, 2004). Las proteínas de anclaje y su interacción con la PKA se describirán en el apartado 1.3.5.

1.3.2. SUBUNIDAD CATALÍTICA, C

La subunidad C de la PKA ha sido purificada a partir de diferentes tejidos de mamíferos (Sugden *et al*., 1976; Reimann y Beham, 1983; Muniyappa *et al*., 1983; Flockhart y Corbin, 1984; Tamanini *et al*., 1991; MacDonald y Storey, 1998), reptiles (Mehrani y Storey, 1995), helmintos (Iltzsch y Mansour, 1987; Thalhofer *et al*., 1988; Jung *et al*., 1995), insectos (Foster y Hall 1988; Haracksaka y Uvardy, 1992; Pfister y Storey, 2002), hongos (Glikin *et al*., 1982; Pastori *et al*., 1985; Franco de Oliveira *et al*., 1994; Sharma y Khuller, 2000) y eucariotas unicelulares (Ochatt *et al*., 1993; Anjard *et al*., 1993; Banerjee y Sarkar, 1992; Zelada *et al*., 1998).

Se trata, en todos los casos, de una **proteína monomérica**. En metazoos, su peso molecular es de aproximadamente 40 kDa, mientras que en hongos y eucariotas unicelulares su peso molecular es, en general, notablemente mayor (Anjard *et al*., 1993; Zelada *et al*., 1998).

La subunidad C de la PKA también ha sido **obtenida por ingeniería genética**, mediante la expresión de un ADNc murino en *E. coli* (Slice y Taylor, 1989; Yonemoto *et al*., 1991; Gamm *et al*., 1996) o en células NIH 3T3 de mamíferos (Olsen y Uhler, 1989; Beebe *et al*., 1992). En ambos casos se obtuvo una proteína catalíticamente activa.

En el año 1983, se determinó la **secuencia** completa (350 aminoácidos) de la subunidad C purificada de corazón bovino (Shoji *et al*., 1983), y ocho años más tarde, se resolvió la **estructura cristalográfica** de la subunidad C recombinante de ratón (Knighton *et al*., 1991a; 1991b). Dado que fue la primera proteína quinasa de la que se determinó su secuencia y su estructura tridimensional, la subunidad C constituyó una referencia en el estudio de esta superfamilia de enzimas.

1.3.2.1. ISOENZIMAS DE SUBUNIDAD C

La existencia de diferentes formas isoenzimáticas de la subunidad C de la PKA se conoce desde hace tiempo (Sugden *et al*. 1976; Peters *et al*., 1977), pero fue a partir de 1980, gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular, cuando se demostró definitivamente la existencia de diferentes genes en una misma especie que codifican esta proteína.

En **mamíferos existen dos isoenzimas**, producto de dos genes diferentes, denominadas **Cα** (Uhler *et al*., 1986a; Adavani *et al*., 1987; Maldonado y Hanks, 1988; Wiemann *et al*., 1991; 1992) y **Cβ** (Showers y Maurer, 1986; Uhler *et al*., 1986b; Adavani *et al*., 1987). Ambas poseen un 93% de homología y se expresan en la mayoría de los tejidos, aunque los niveles de Cβ son menores que los de Cα (Showers y Maurer, 1986; Uhler *et al*., 1986b). En **primates** existe una tercera isoenzima, denominada **Cγ**, que se expresa exclusivamente en células germinales de testículos, y posee un 83% y un 79% de homología con las isoformas Cα y Cβ, respectivamente (Beebe *et al*., 1990). El gen que codifica para Cγ es un retroposón derivado de la transcripción inversa de un ARNm procedente del gen Cα (Reinton *et al*., 1998). En humanos se ha identificado otro gen, localizado en el cromosoma X, que codifica una subunidad C denominada PrKX o proteína quinasa X. Se trata de una subunidad C atípica, con una región N-terminal diferente al resto de subunidades C. PrKx sólo interacciona con la subunidad R tipo I y su función es actualmente desconocida (Zimmermann *et al*., 1999; Diskar *et al*., 2007).

En los últimos años se ha identificado, en diferentes especies de mamíferos, una **variante isoenzimática** de la subunidad Cα, denominada **Cα2** o Cs, generada por corte y empalme alternativo de dos diferentes exones 1 (San Agustin *et al*., 1998; 2000; Desseyn *et al*., 2000; Reinton *et al*., 2000). Cα y Cα2 se diferencian, por tanto, en la región N-terminal –los 15 primeros aminoácidos de Cα son reemplazados por 6 aminoácidos en Cα2– y sufren una diferente modificación post-

traduccional a este nivel: Cα contiene ácido mirístico unido a una Gly N-terminal mientras que Cα2 posee una molécula de ácido acético unido a una Ala N-terminal (San Agustin *et al*., 1998; Desseyn *et al*., 2000) –ver apartado 1.3.2.2: modificaciones post-traduccionales. Cα2 es la isoforma mayoritaria en espermatozoides, localizándose fundamentalmente en la parte intermedia del flagelo (Reinton *et al*., 2000) y forma parte de un sistema específico de señalización mediado por AMPc, implicado en la maduración del esperma, que incluye, además, una adenilato ciclasa atípica activada por bicarbonato (Harrison, 2004). La importancia de esta isoforma de subunidad C en la fertilidad se ha demostrado recientemente al comprobar que ratones transgénicos, carentes de Cα2, eran infértiles, a pesar de que podían producir un número normal de espermatozoides (Nolan *et al*., 2004). La presencia de una isoforma específica de espermatozoides ha sido también observada recientemente en peces; esta isoforma, que muestra una secuencia idéntica en un 87% a la Cα2 ovina, y al igual que ésta, posee un dominio N-terminal más corto que Cα, se expresa en testículos y esperma de trucha, localizándose cerca del brazo externo de dineína que forma parte del axonema del flagelo de los espermatozoides (Itoh *et al*., 2003).

Al igual que ocurre con Cα, también se han encontrado, en varias especies de mamíferos, diferentes **variantes isoenzimáticas de Cβ**, generadas por corte y empalme alternativo de diferentes exones. Así, en bovino, se ha identificado una variante denominada Cβ2 que se genera por corte y empalme alternativo del exón que codifica la región N-terminal, y que posee un peso molecular de 46 kDa, siendo la isoforma de mayor tamaño descrita hasta el momento en mamíferos (Wiemann *et al*., 1991). Cβ2 es muy poco abundante y se expresa mayoritariamente en corazón, hígado y bazo (Thullner *et al*., 2000). En ratón, se han descrito dos nuevas variantes de Cβ, denominadas Cβ2 y Cβ3, resultado del uso de diferentes exones 1 con distintos sitios de iniciación de la transcripción. Ambas variantes carecen de ácido mirístico en el extremo N-terminal y se expresan específicamente en cerebro (Guthri *et al*., 1997). En humanos, se han identificado también seis variantes generadas a partir del gen Cβ, denominadas Cβ1 –originalmente Cβ– Cβ2, Cβ3, Cβ4, Cβ4ab y Cβ4abc. Todas se diferencian en el extremo N-terminal y se originan por corte y empalme alternativo de cuatro tipos de exón 1 –denominados *1.1*, *1.2*, *1.3* y *1.4*– y tres exones llamados *a*, *b* y *c*, situados entre el exón 1 y el 2. La variante Cβ2 es homóloga de la Cβ2 bovina, mientras que las isoformas Cβ3 y Cβ4 son homólogas de las murinas Cβ3 y Cβ2 respectivamente. Cβ4ab y Cβ4abc representan isoformas no identificadas en otras especies. En cuanto a su expresión, Cβ2 es abundante en tejidos del sistema inmune, mientras que Cβ3 y Cβ4 se detectaron únicamente en cerebro (Orstavik *et al*., 2001).

A excepción de Cα2, cuyo papel fundamental en la maduración del esperma ha sido demostrado *in vivo*, no se conoce hasta el momento la función específica de cada una de las

variantes isoenzimáticas de subunidad C, aunque se han puesto de manifiesto algunas diferencias bioquímicas entre ellas. Por ejemplo, estudios llevados a cabo con las isoformas Cα y Cβ1, expresadas en *E. coli*, revelaron algunas diferencias en su movilidad en SDS-PAGE y también en los datos cinéticos de afinidad por péptidos sustrato e inhibidores. Además, una holoenzima que contiene Cα como subunidad C es cinco veces menos sensible a la activación por AMPc que aquélla que contiene Cβ (Gam y Uhler, 1996). Por otra parte, la isoforma Cγ, específica de células germinales de primates, muestra una característica que la diferencia de las isoformas Cα y Cβ: su insensibilidad a la inhibición por la proteína PKI (Walsh *et al*., 1971; Beebe *et al*., 1990); además, Cγ posee unos valores de K_m y $V_{máx}$ para péptidos o proteínas sustrato notablemente inferiores a los de la isoforma Cα (Zhang *et al*., 2004). Sin embargo, la importancia funcional de estas diferencias es todavía desconocida.

Tabla 1.3. Isoformas de subunidad C en mamíferos e invertebrados

gen	Organismo	isoformas identificadas[1]	características
Cα	mamíferos	Cα, Cα2 (Cs[2])	Cα: se expresa en todos los tejidos Cα2: específica de espermatozoides
Cβ		Bovino: Cβ1, Cβ2 Ratón: Cβ1, Cβ2, Cβ3 Humanos: Cβ1, Cβ2, Cβ3,Cβ4, Cβ4ab, Cβabc	Cβ1: se expresa en todos los tejidos Cβ2-Cβ4: diferente expresión tisular
Cγ	Primates	--	Células germinales de testículos
PrKX	Humanos	--	Subunidad C atípica
Kin1	*Caenorhabditis*	12 isoformas	
F47F2.1b	*Caenorhabditis*	--	
CAPL	*Aplysia*	4 isoformas	
DCO	*Drosophila*	--	
X[3]	*Amblyomma*	3 isoformas	
X	*Blastocladiella*	--	Proteínas con una secuencia N-terminal adicional sin homología en las subunidades C de mamíferos
X	*Aspergillus*	--	
TRPK1 *TRPK2* *TRPK3*	*Saccharomyces*	--	
DdPK3	*Dyctiostelium*	--	Secuencia N-terminal adicional de 292 aminoácidos con respecto a Cα

[1]*isoformas generadas por corte y empalme alternativo de diferentes exones*
[2]*una proteína homóloga a Cs fue identificada también en peces*
[3]*X, gen sin denominación específica*

La existencia de diferentes **isoenzimas** de subunidad C es conocida también **en diferentes especies de invertebrados**. En el gusano *Caenorhabditis elegans* se han identificado dos genes que codifican la subunidad C, denominados *kin-1* (Gross *et al*., 1990) y *F47F2.1b* (Tabish *et al*., 1999). A partir del primero se originan doce diferentes isoformas mediante corte y empalme alternativo de seis variantes del exón 1 N-terminal (Tabish *et al*., 1999), en combinación con dos variantes del exón C-terminal (Gross *et al*., 1990). Recientemente se han aislado varias de estas isoformas, expresadas en *C. elegans* y también en *C. briggsae*, con pesos moleculares entre 40 y 44 kDa. Una de ellas, que contiene la secuencia codificada por el exón N1, posee, al igual que Cα y Cβ, una molécula de ácido mirístico unida al extremo N-terminal (Bowen *et al*., 2006).

En el molusco *Aplysia californica* se ha identificado un gen ($C\text{-}_{APL}$) que codifica la subunidad C, a partir del cual se generan cuatro variantes isoenzimáticas por combinación de dos diferentes secuencias en el extremo N-terminal –codificadas por los exones *N1* y *N2*– con dos diferentes secuencias en medio de la cadena peptídica –codificadas por los exones *A1* y *A2*. La isoforma que contiene la secuencia codificada por *N1* es homóloga de la isoforma Cα de mamíferos y contiene ácido mirístico unido al extremo N-terminal (Beushausen *et al*., 1988; 1992). Las isoformas N1A1 y N2A2 recombinantes han sido purificadas y, a pesar de mostrar una afinidad similar por diferentes péptidos, fosforilan proteínas diferentes en fracciones subcelulares obtenidas a partir de neuronas del molusco, lo que sugiere que desempeñan funciones diferentes en la modulación neuronal (Panchal *et al*., 1994).

En *Drosophila* se ha identificado un gen (*DC0*) que codifica una subunidad C con una homología del 82% con la isoforma Cα de mamíferos (Kalderon y Rubin, 1988; Foster *et al*., 1988); y también se ha clonado un ADNc de la abeja *Apis mellifera* que codifica una proteína de 353 aminoácidos con un 94% de identidad con respecto a *DCO* (Eisenhardt *et al*., 2001). En la garrapata de las especies *Amblyomma americanum* y *Amblyomma hebraeum* se han clonado los ADNc de tres isoformas generadas, probablemente, por corte y empalme alternativo a partir de un único gen. Las tres isoformas se diferencian en sus extremos N-terminales. La denominada C1 es un 83% idéntica a Cα y posee una Gly N-terminal que puede ser miristilada. En cambio, las isoformas C2 y C3 poseen secuencias N-terminales muy largas y con poca homología con las secuencias correspondientes a isoformas de mamíferos (Palmer *et al*., 1999; Tabish *et al*., 2006).

En resumen, **la existencia de múltiples isoformas de subunidad C parece ser un hecho común tanto en mamíferos como en invertebrados**. Las razones que justifican esta multiplicidad de isoformas no están claras, pero es posible que las diferencias estructurales, centradas sobre todo en los extremos N- y C-terminales, puedan influir específicamente en la interacción con la

subunidad R (Tabish *et al*., 1999), y/o puedan ser responsables de una fosforilación diferencial de diferentes subconjuntos de proteínas diana (Bowen *et al*., 2006).

La **subunidad C de hongos y eucariotas unicelulares** es una proteína de mayor tamaño en comparación con la de metazoos. Esto es debido a que presentan una extensión –entre 27 y 292 aminoácidos– en el extremo N-terminal, que no tiene homología con las isoformas de mamíferos. Otra característica es que carecen de la Gly N-terminal y por tanto no contienen ácido mirístico unido a este extremo. En los hongos pluricelulares *Blastocladiella emersonii* y *Aspergillus niger* se ha identificado un único gen que codifica la subunidad C. Se trata de proteínas de 424 y 480 aminoácidos respectivamente –Cα tiene 350– con una secuencia en la región N-terminal totalmente diferente a las isoformas de mamíferos, pero que sin embargo mantienen una elevada homología con éstas a nivel del dominio catalítico (Franco de Olilveira *et al*., 1994). En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado tres genes denominados *TPK1*, *TPK2* y *TPK3* que codifican proteínas con secuencias adicionales de entre 27–44 aminoácidos en el extremo N-terminal (Toda *et al*., 1987). Finalmente, en *Dyctiostelium discoideum* se ha identificado un gen denominado *DdPK3* o *pkaC,* que codifica una proteína de 648 aminoácidos y un peso molecular de 73 kDa, con una secuencia adicional en el extremo N-terminal de 292 aminoácidos con respecto a Cα (Mann *et al*., 1992; Anjard *et al*., 1993).

1.3.2.2. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE LA SUBUNIDAD C

La subunidad C, una vez sintetizada, sufre diferentes modificaciones covalentes, las cuales, en algunos casos, también generan distintas variantes isoenzimáticas separables mediante cromatografía de intercambio iónico. Algunas de estas modificaciones post-traduccionales, como la fosforilación, son fundamentales para que la enzima adquiera su conformación activa; de otras, en cambio, no se conoce todavía con exactitud cuál es su función (revisión: Gesellchen *et al*., 2006).

1.3.2.2.1. Fosforilación

La subunidad C recombinante, expresada en *E. coli*, contiene cuatro sitios de fosforilación: Ser^{10}, Ser^{139}, Thr^{197} y Ser^{338} (Yonemoto *et al*., 1993a). Sin embargo, **la subunidad C** purificada a partir de tejidos **de mamíferos se encuentra fosforilada solamente en dos residuos: Thr^{197} y Ser^{338}** (Shoji *et al*., 1979; 1983; Yonemoto *et al*., 1997). Además de estos dos sitios, la enzima de mamíferos también puede autofosforilarse *in vitro* en la Ser^{10}, aunque la proteína purificada carece de fosfato unido a este aminoácido, y actualmente se desconoce la posible importancia fisiológica de esta fosforilación (Toner-Webb *et al*., 1992).

Desde hace tiempo se sabe que la **fosforilación de la Thr^{197} es una etapa esencial en la maduración de la subunidad C**, y es absolutamente necesaria para que la enzima sea catalíticamente activa (Steinberg *et al*., 1993; Adams *et al*., 1995; Yonemoto *et al*., 1997). En la estructura tridimensional de la proteína (ver apartado 1.3.2.3.1), este aminoácido se localiza en el denominado «bucle de activación» del centro activo, y aparece siempre fosforilado, estableciendo múltiples enlaces, a través del grupo fosfato, con otros aminoácidos de la enzima (Knighton *et al*., 1991a). Estudios recientes, basados en simulaciones computacionales de los cambios de conformación durante el proceso catalítico de una subunidad C activa, en comparación con una enzima mutante T^{197}A, demostraron que la P-Thr^{197}, además de facilitar la transferencia del grupo fosfato estabilizando el estado de transición mediante múltiples interacciones electrostáticas, influye notablemente en la conformación del centro activo y en la dinámica general de la enzima, incluida su capacidad para interaccionar con la subunidad R (Cheng *et al*., 2005; 2006; Iyer *et al*., 2005; Kornev *et al*., 2006).

En los últimos años ha existido cierta controversia en torno al mecanismo de fosforilación *in vivo* de la Thr^{197}. Inicialmente, dado que la subunidad C recombinante expresada en *E. coli* se autofosforila, probablemente a través de una reacción intermolecular, se asumió que la incorporación de fosfato en este aminoácido ocurría siempre mediante autofosforilación (Yonemoto *et al*., 1993a; Steinberg *et al*., 1993). Sin embargo, más tarde se comprobó que la Thr^{197} es fosforilada de forma mucho más eficiente por una proteína quinasa heteróloga, identificada como **proteína quinasa dependiente de fosfoinosítido** o PDK-1 (Cauthrom *et al*., 1998); además, esta proteína quinasa es capaz de fosforilar *in vitro* y activar una subunidad C no fosforilada e inactiva, expresada en presencia de H89, un inhibidor específico de la PKA. (Cheng *et al*., 1998). Recientemente, Moore *et al*. (2002), a través de la introducción de mutaciones puntuales en la subunidad C, llegan a la conclusión de que la maduración de la enzima *in vivo* se produce probablemente mediante la fosforilación por PDK-1 y no por autofosforilación. En el proceso de reconocimiento por PDK-1 es importante un motivo estructural situado en el extremo C-terminal de la subunidad C –compartido por con otras proteína quinasas del grupo AGC– denominado casquete hidrofóbico –ver estructura subunidad C (Gold *et al*., 2006).

Por otra parte, la P-Thr^{197} fue considerada inicialmente inaccesible a la acción de las fosfatasas –se denomina fosforilación estable– aunque más tarde se demostró que, al menos en determinadas condiciones, puede ser **defosforilada *in vitro* por la proteína fosfatasa 2A** (Liauw y Steinberg, 1996). La resistencia a la defosforilación es debida probablemente a la presencia cercana de la Cys^{199}, ya que la oxidación de este residuo de cisteína, o su sustitución por alanina, provoca una rápida y efectiva eliminación del fosfato (Humphries y Taylor, 2004). La oxidación de la Cys^{199}

puede ocurrir *in vivo* en determinadas condiciones (Humphries *et al*., 2002), y por ello se ha planteado que podría constituir un nuevo mecanismo regulador de la actividad de la subunidad C, dado que favorecería la defosforilación de la P-Thr^{197} y, en consecuencia, la inactivación de la enzima (Humphries y Taylor, 2004).

La función de la fosforilación de la **Ser^{338}**, el segundo sitio de fosforilación, localizado en el extremo C-terminal de la proteína, es menos clara. Inicialmente se pensó que solamente aportaba estabilidad a la molécula (Yonemoto *et al*., 1997); sin embargo, estudios más recientes indican que la fosforilación de este aminoácido **también es necesaria para obtener una enzima activa**, ya que una subunidad catalítica mutante, K^{72}H, es expresada como una enzima no fosforilada, inactiva, e incapaz de autofosforilarse *in vitro* a nivel de la Ser^{338} (Iyer *et al*., 2005). Basándose en estos datos, estos autores proponen un posible proceso de activación de la subunidad catalítica, que consta de dos etapas consecutivas: (*i*) la fosforilación de la Thr^{197} por PDK-1, que sería necesaria para (*ii*) la autofosforilación de la enzima a nivel de la Ser^{338}. Ambas fosforilaciones serían necesarias para obtener una enzima madura y completamente activa.

1.3.2.2.2. Miristilación

Cuando se determinó la secuencia completa de la subunidad C se observó que el aminoácido N-terminal se hallaba bloqueado por un grupo funcional desconocido (Shoji *et al*., 1981), que pronto se identificó como ácido n-tetradecanoico o ácido mirístico (Carr *et al*., 1982). Actualmente se sabe que **la mayoría de las variantes isoenzimáticas** de la subunidad C, tanto de mamíferos como de invertebrados, **contienen** una glicina N-terminal que se encuentra acilada con una molécula de **ácido mirístico**. Una excepción es la isoforma Cα2, mayoritaria en el flagelo de espermatozoides, la cual, como se ha descrito anteriormente, posee una molécula de ácido acético unido a una alanina N-terminal (San Agustin *et al*., 1998; Desseyn *et al*., 2000)

La **importancia fisiológica de la miristilación de la subunidad C no se conoce** con exactitud. Esta modificación post-traduccional no es imprescindible para que la enzima adquiera su conformación activa, dado que una subunidad C recombinante, expresada en *E. coli*, es totalmente activa y capaz de unirse a la subunidad R, a pesar de no contener ácido mirístico. Sin embargo, esta enzima recombinante es muy sensible a la desnaturalización por calor, en comparación con la enzima purificada a partir de tejidos de mamíferos, lo que sugiere que la presencia de ácido mirístico aporta estabilidad estructural a la proteína (Slice y Taylor, 1989; Yonemoto *et al*., 1993b; Herberg *et al*., 1997; Tholey *et al*., 2001)

La acilación de proteínas se asocia habitualmente con su anclaje a membranas (revisión: Magee y Seabra, 2005). En el caso concreto de la subunidad C, se ha descrito que un péptido miristilado, derivado de la región N-terminal de la isoforma Cα, puede mediar la unión a membranas (Struppe *et al*., 1998). Además, se ha comprobado que una proteína quimérica derivada de la proteína v-src, en la que se sustituyeron los 14 primeros aminoácidos por la correspondiente secuencia N-terminal miristilada de Cα, se localiza en la membrana plasmática (Silverman y Resh, 1992). Sin embargo, a pesar de estos indicios, no hay evidencias de que *in vivo* la subunidad C se halle asociada a membranas celulares. Al contrario, como se describe en el apartado 1.3.5, el anclaje de la PKA a diversas estructuras celulares, incluidas membranas, tiene lugar a través de la subunidad R.

Recientemente se ha demostrado que la miristilación también puede estar implicada en la autoinhibición de ciertas proteína quinasas, como la tirosina quinasa c-abl (Nagar *et al*., 2003; Hantschel *et al*., 2003), aunque esto tampoco parece ocurrir en la subunidad C. Por tanto, la implicación de la miristilación en otras funciones diferentes a la de aportar estabilidad estructural a la molécula no ha sido demostrada hasta la fecha, y requiere mayor investigación.

1.3.2.2.3. Desamidación

Aproximadamente la tercera parte del total de subunidad C de tejido muscular de diferentes mamíferos contiene ácido aspártico en la posición 2, como consecuencia de la desamidación post-traduccional de la asparagina que ocupa esta posición en la proteína secuenciada (Jedrzejewski *et al*., 1998). Esta modificación post-traduccional es la causa de la existencia de dos variantes isoenzimáticas de subunidad C conocidas con anterioridad; diferentes autores habían separado, mediante cromatografía de intercambio catiónico, a partir de una preparación electroforéticamente homogénea de subunidad C, dos isoformas, denominadas C_A y C_B, con distinto pH isoeléctrico (Kinzel *et al*., 1987; Hotz *et al*., 1989a). Ambas poseen idéntica masa molecular, determinada mediante espectroscopía de masas, y contienen un ácido mirístico y dos fosfatos unidos (Herberg *et al*., 1993). Hotz *et al*. (1989b), y más tarde Jedrzejewski *et al*. (1998), demostraron que la única **diferencia estructural entre C_A y C_B es la presencia de Asp o Asn en la posición 2** de la proteína, a continuación de la Gly N-terminal miristilada. En realidad, la fracción C_A contiene una mezcla de los productos de los genes Cα y Cβ con Asp en la posición 2, mientras que la fracción C_B, la más abundante, contiene ambos productos pero con Asn en la citada posición. El hecho de que el Asp^2 no esté codificado ni en Cα ni en Cβ indica que se genera necesariamente mediante una desamidación de la Asn^2. La carga negativa adicional aportada por el Asp en comparación con la

Asn, explica el menor valor de *pI* de C_A con respecto a C_B y la separación de ambas fracciones mediante cromatografía de intercambio iónico (Jedrzejewski *et al*., 1998).

El significado biológico de la conversión parcial de la Asn^2 en Asp^2 no se conoce con claridad. No se observaron diferencias entre C_A y C_B en cuanto a su actividad enzimática ni a su capacidad para reasociarse con la subunidad R (Kinzel *et al*., 1987) o con el inhibidor PKI (Van Patten *et al*., 1988). Por otra parte, la presencia de Asn o Asp en un péptido correspondiente a la región N-terminal de Cα, no supone ningún cambio apreciable en la estructura secundaria que adopta este péptido (Tholey *et al*., 2001). Sin embargo, recientemente, Pepperkok *et al*. (2000), a través de experimentos en los que microinyectaron muestras de C_A y C_B marcadas con fluorescencia, en el citoplasma de células en cultivo, observaron que la fracción Asn^2 alcanzaba una mayor concentración en el núcleo celular que la Asp^2, lo que sugiere que esta modificación post-traduccional puede **contribuir a la regulación de la distribución intracelular de la subunidad C** libre.

1.3.2.3. ESTRUCTURA DE LA SUBUNIDAD C

1.3.2.3.1. Estructura global

En el **año 1991** se resolvió, mediante difracción de rayos X, la **estructura tridimensional de la subunidad C** –isoforma Cα– formando un complejo binario con un péptido de 20 aminoácidos derivado de la proteína inhibidora PKI (Knighton *et al*., 1991a; 1991b). Dado que fue la primera estructura resuelta correspondiente a una proteína quinasa constituyó **un modelo para el estudio de otros miembros de esta familia de enzimas**. Dos años más tarde, se determinó la estructura de la subunidad C formando un complejo ternario con MgATP y el péptido mencionado anteriormente (Zheng *et al*., 1993a). En los últimos años se han obtenido también nuevas estructuras de la subunidad C en situaciones correspondientes a la mayoría de las etapas del ciclo catalítico, incluido el estado de transición (Bossemeyer *et al*., 1993; Zheng *et al*., 1993b; Narayana *et al*., 1997a; 1997b; 1999; Li *et al*., 2002; Madhusudan *et al*., 2002; Akamine *et al*., 2003). El análisis comparativo de estas estructuras permitió observar no sólo los elementos estructurales clave en la unión de sustratos, sino también los cambios conformacionales que ocurren en la enzima durante el proceso de catálisis (ver revisiones: Taylor *et al*., 1993a; 1993b; 2005; Cox *et al*., 1994; Smith *et al*., 1999).

La **estructura global de la subunidad C** se puede dividir en tres partes: **(*a*) *el segmento o tallo N-terminal*** (aminoácidos 1-39), **(*b*) *el segmento o tallo C-terminal*** (aminoácidos 301-350), que se hallan flanqueando **(*c*) *el dominio o centro catalítico*** (aminoácidos 40-300) definido por Hunter

y colaboradores (Hanks y Hunter, 1988), y conservado en todas las proteína quinasas (figura 1.5A). En la estructura 3D, los segmentos N- y C-terminales se hallan íntimamente conectados con el centro catalítico y desempeñan funciones importantes en la subunidad C, mediando interacciones proteína-proteína.

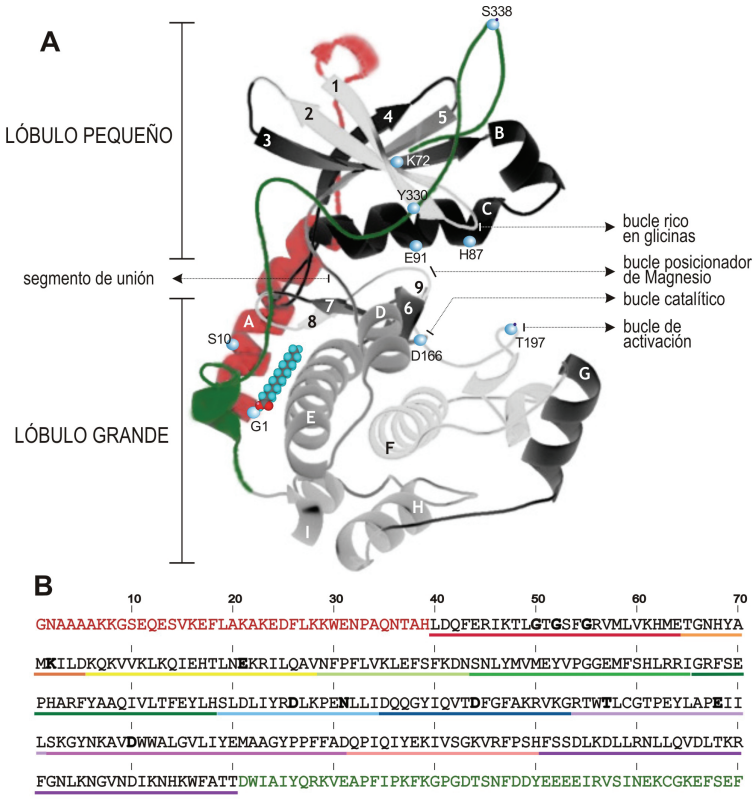


Figura 1.5. Estructura de la subunidad C.
Estructura tridimensional de la subunidad Cα (A) donde se muestra el segmento N-terminal (rojo), el segmento C-terminal (verde) y el dominio catalítico (gris), y su correspondencia en la secuencia aminoacídica de la proteína (B); también se señalan los elementos estructurales: α-hélices (A-I), hojas-β (1-9) y bucles, asi como aminoácidos importantes en la función catalítica (ver texto). En las figuras B y C se muestra, en colores, la correlación entre los subdominios del dominio catalítico, definidos por Hanks *et al*. 1988, con la estructura 3D de la subunidad C. Imagen adaptada de una original de «Protein Kinase Resource» basada en una estructura por difracción de rayos X de S. Taylor y J. Sowadsky, Univ. California, San Diego.

A) SEGMENTO O TALLO N-TERMINAL

Como se ha descrito en el apartado 1.3.2.1, la secuencia de la región N-terminal (aminoácidos 1-39) es la más variable entre las numerosas isoenzimas de la subunidad C que se generan por corte y

empalme alternativo de diferentes tipos de exón nº 1, lo que sugiere que este segmento podría desempeñar un papel importante en la localización de la proteína y/o en la **interacción con otras proteínas** (Tabish *et al*., 1999; Bowen *et al*., 2006).

Como se observa en la figura 1.5A, esta región –en color rojo– presenta, en su mayor parte, una estructura secundaria en α-hélice, denominada **hélice A**. Una secuencia situada en esta α-hélice (aminoácidos 15-30) es responsable de la interacción de la subunidad C con una proteína recientemente identificada, denominada AKIP («*A k*inase *i*nteracting *p*rotein») que dirige la subunidad C al núcleo (Sastri *et al*., 2005). Por otra parte, el Trp^{30}, localizado también en esta hélice, contribuye a estabilizar la región bisagra entre los lóbulos pequeño y grande del dominio catalítico, de tal manera que su sustitución por Tyr o Ala provoca una importante inestabilidad en la proteína (Herberg *et a*l., 1999).

En este segmento ocurren también **varias modificaciones post-traduccionales**, que hemos descrito anteriormente, como la miristilación de la Gly N-terminal, la desaminación de la Gln^2 y la fosforilación de la Ser^{10} – ver apartado 1.3.2.2 .

B) SEGMENTO O TALLO C-TERMINAL

El segmento C-terminal –en color verde en la figura 1.5A– se divide, a su vez, en **tres regiones funcionalmente diferentes**, denominadas: región asociada al lóbulo pequeño o N (NLT), región asociada al centro activo (AST) y región asociada al lóbulo grande o C (CLT) (Kannan *et al*., 2007). La región NLT contiene el denominado **casquete hidrofóbico C-terminal** (**Phe^{347}**-Ser-Glu-**Phe^{350}**) que se encuentra plegado dentro de un bolsillo hidrofóbico situado entre las β-hélices 3 y 5, y sirve como sitio de anclaje al lóbulo pequeño. Este casquete es una forma truncada del llamado motivo hidrofóbico o HM (Phe-X-X-Phe-Ser/Thr-Tyr), conservado en todas las proteínas quinasas del grupo AGC –al que pertenece la PKA– y que constituye un elemento de reconocimiento por otras proteína quinasas, como por ejemplo la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítido (PDK-1) (Gold *et al*., 2006). Como se ha mencionado en el apartado 3.2.2.1, la PDK-1 es, probablemente, responsable de la fosforilación *in vivo* de la Thr^{197}, fundamental para la activación de la subunidad C (Moore *et al*., 2002).

La región AST, intermedia de este segmento, desempeña un papel fundamental actuando como **«puerta» de entrada/salida del ATP al/del sitio de unión en el centro activo**. En ausencia de ATP, esta región se halla desordenada, de tal manera que permite el acceso del nucleótido al centro activo. Una vez ocupado el centro activo, este segmento se reorganiza, «cerrándose la puerta» de

entrada del ATP. En esta situación, un aminoácido de esta región, la Tyr^{330}, interacciona tanto con el ATP como con la Arg de la posición -3 del péptido sustrato (Narayana *et al*., 1997a).

Finalmente, la región CLT interacciona con el **segmento de unión** entre lóbulos y con el bucle entre la α-hélice C y la β-hebra 4 que actúan como bisagra para el movimiento de la hélice C inducido por la unión de ATP.

En el segmento C-terminal se encuentra también la Ser^{338}, fosforilada en todas las subunidades C, y que, tal como se ha descrito en el apartado 1.3.2.2.1, es un elemento esencial para que la enzima adquiera su conformación activa (Iyer *et al*., 2005).

C) DOMINIO CATALÍTICO

La estructura del **dominio catalítico** o centro catalítico –aminoácidos 40-300– se muestra en color gris en la figura 1.5A Como se observa, este dominio **se organiza en dos lóbulos**, denominados lóbulo pequeño o lóbulo N y lóbulo grande o lóbulo C, unidos a través de una pequeña secuencia bisagra o segmento de unión: aminoácidos 120-127. **Esta arquitectura bilobular es compartida por todas las proteína quinasas**. El lóbulo pequeño, correspondiente a la parte N-terminal del dominio, está constituido fundamentalmente por una estructura en hoja β formada por 5 hebras anti-paralelas (1-5), y dos α-hélices denominadas hélice B y C. La función de este lóbulo es la de unir el nucleótido ATP, posicionando adecuadamente el fosfato γ para ser transferido al péptido o proteína sustrato.

En el lóbulo grande, en cambio, predominan las α-hélices, aunque contiene también una pequeña estructura en hoja β (hebras 6-9) con aminoácidos esenciales para la catálisis. El **centro activo se sitúa en la hendidura entre los dos lóbulos**; el extremo final, estrecho, se encuentra cerca de la región bisagra, mientras que la parte más ancha o «boca» de la hendidura se encuentra hacia el exterior. La parte superior e inferior de la hendidura se hallan delimitadas por aminoácidos del lóbulo pequeño –fundamentalmente de la α-hélice C– y del lóbulo grande, respectivamente. En este centro activo, el anillo de adenina del ATP se sitúa en la base de la hendidura y el péptido se acopla en el extremo externo de la hendidura formado por el lóbulo grande, de tal manera que el fosfato γ del ATP puede ser transferido directamente al OH del aminoácido fosforilable (figura 1.6A).

Como se ha descrito en el apartado 1.2, la secuencia del centro catalítico de las proteína quinasas se divide en 12 subdominios (Hanks *et al*., 1988) que se muestran, en diferentes colores, en la estructura de la subunidad C de la figura1.5C. En estos subdominios se encuentran una serie de aminoácidos invariables o muy conservados entre todas las proteína quinasas. A pesar de que

estos residuos se hallan dispersos en la estructura primaria, **la estructura tridimensional muestra** que la mayoría de ellos se agrupan en ciertos elementos estructurales en torno a la hendidura entre los dos lóbulos, que constituye el centro activo. Como era predecible, estos **aminoácidos son fundamentales en la unión del ATP y en el proceso de catálisis**.

Estos elementos estructurales fundamentales en la subunidad C son los siguientes:

- ***Bucle rico en glicinas***: motivo **Gly**^{50}-Thr-**Gly**-Ser-Phe-**Gly**^{55}, localizado en el lazo que une las β-hebras 1 y 2 del lóbulo pequeño, y conservado en toda la familia de las proteína quinasas. Se denomina también motivo posicionador de nucleótido o MPN ya que los aminoácidos de este bucle son particularmente importantes para orientar adecuadamente los fosfatos del ATP.

- ***Lys*^{72}:** se localiza en la β-hebra 3 del lóbulo pequeño y es conservada en la mayoría de las proteína quinasas. La importancia de este aminoácido en la actividad de la subunidad C fue puesta de manifiesto mediante marcaje de afinidad utilizando un análogos del ATP (Zoller *et al*., 1981), y su sustitución genera una enzima inactiva y no fosforilada (Iyer *et al*., 2005). La estructura tridimensional muestra que la Lys^{72} interacciona directamente con los grupos fosfatos α y β del ATP.

- ***α-hélice C*:** localizada en el lóbulo pequeño. Un aminoácido situado en esta hélice, el Glu^{91}, constituye el tercer elemento estructural esencial en este lóbulo, ya que establece un enlace iónico con la Lys^{72}, posicionándola adecuadamente. Por tanto, este aminoácido también está implicado, aunque indirectamente, en la unión del ATP. La α-hélice C, en su conjunto, se extiende a lo largo de todo el hueco que constituye el sitio de unión del ATP y es un elemento fundamental en la estructura de todas las proteína quinasas, porque su correcta orientación es clave para que la enzima adquiera su conformación activa. Esta orientación adecuada se produce a través de las múltiples interacciones que establecen muchos de los aminoácidos que la forman con otras zonas de la proteína. Uno de ellos es la His^{87} que, en la conformación cerrada de la enzima, interacciona con el fosfato de la fosfo-Thr^{197} (véase apartado 1.3.2.3.4).

- ***Segmento de unión de lóbulos*** (aminoácidos 120-127): se sitúa en el bucle entre la β-hebra 5 del lóbulo pequeño y la α-hélice D del lóbulo grande, actuando como nexo de unión entre ambos lóbulos. Dos aminoácidos situados en este segmento, el Glu^{121} y la Val^{123}, interaccionan con el anillo de adenina del ATP, mientras que el Glu^{127} establece un enlace con la ribosa del ATP, y también interacciona con la Arg de la posición -3 del péptido sustrato.

- ***Bucle catalítico*** (aminoácidos 165-171): se localiza entre las β-hebras 6 y 7, en el lóbulo grande. Contiene tres aminoácidos invariables en todas las serina/treonina quinasas: Asp^{166}, Lys^{168} y Asn^{171}. El Asp^{166} interacciona con el hidroxilo del aminoácido fosforilable del péptido/proteína sustrato, y se le ha adjudicado el papel de base catalítica, abstrayendo un protón del grupo OH del aminoácido y favoreciendo, de este modo, su ataque nucleofílico sobre el átomo de fósforo del fosfato γ del ATP. Por su parte, la Lys^{168} interacciona con uno de los oxígenos del fosfato γ del ATP, mientras que la Asn^{171} cumple dos funciones: interacciona con el catión Mg^{2+} unido a los fosfatos α y γ del ATP y establece un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo del Asp^{166}, estabilizando el bucle catalítico. Finalmente, la Arg^{165} interacciona con el fosfato de la Thr^{197}, estableciendo un puente entre el bucle catalítico y el bucle de activación.
- ***Bucle posicionador del Magnesio*****:** se sitúa entre las β-hebras 8 y 9 en el lóbulo grande y contiene un motivo estructural, denominado motivo DFG (aminoácidos 184-186). El aminoácido clave en este bucle es el Asp^{184}, que establece contactos polares con los tres grupos fosfato del ATP, bien directamente o bien de forma indirecta a través del átomo de Mg^{2+} que se halla coordinado con los fosfatos β y γ del ATP en el complejo MgATP.
- ***Bucle de activación*** (aminoácidos 193-197): se trata de un segmento extremadamente importante y que, en la mayoría de las proteína quinasas, es muy sensible a la regulación por fosforilación. Se localiza entre la β-hebra 9 y la α-hélice G, en el lóbulo grande. El aminoácido esencial en este bucle es la Thr^{197} que aparece fosforilada en todas las estructuras de la subunidad C resueltas, y establece múltiples interacciones con otros aminoácidos tanto del lóbulo pequeño como del lóbulo grande. Al igual que la α-hélice C, el bucle de activación debe estar correctamente orientado para que la enzima adopte una conformación plenamente activa (Kornev *et al*., 2006).
- ***Bucle P + 1.*** (aminoácidos 198-205): se localiza a continuación del bucle de activación y proporciona una superficie hidrofóbica de anclaje para el aminoácido P+1 de la secuencia consenso del péptido/proteína sustrato de la PKA. También contribuye al reconocimiento de la Arg P-6, por lo que se puede considerar como el bucle de posicionamiento del péptido sustrato.

1.3.2.3.2. Sitio de unión de MgATP

Inicialmente, el sitio de unión del ATP en la subunidad C fue mapeado mediante diferentes aproximaciones experimentales en las que se utilizaron análogos del ATP, algunos de ellos

marcados con fluorescencia, que se unían covalentemente a algún aminoácido del centro activo (revisión: Taylor *et al.*, 1990). Mediante estos análisis se comprobó, por ejemplo, la importancia clave de la Lys[72] en la unión del nucleótido (Zoller *et al.*, 1981).

La determinación de la estructura de rayos X de la subunidad C formando un complejo ternario con MgATP y el péptido inhibidor (Bossemeyer *et al.*, 1993; Zheng *et al.*, 1993a) reveló que **la unión del ATP al centro activo tiene lugar a través de interacciones que se establecen a tres niveles**: con la **base nitrogenada adenina**, con el **anillo de ribosa** y con los **grupos fosfato** (figura 1. 6).

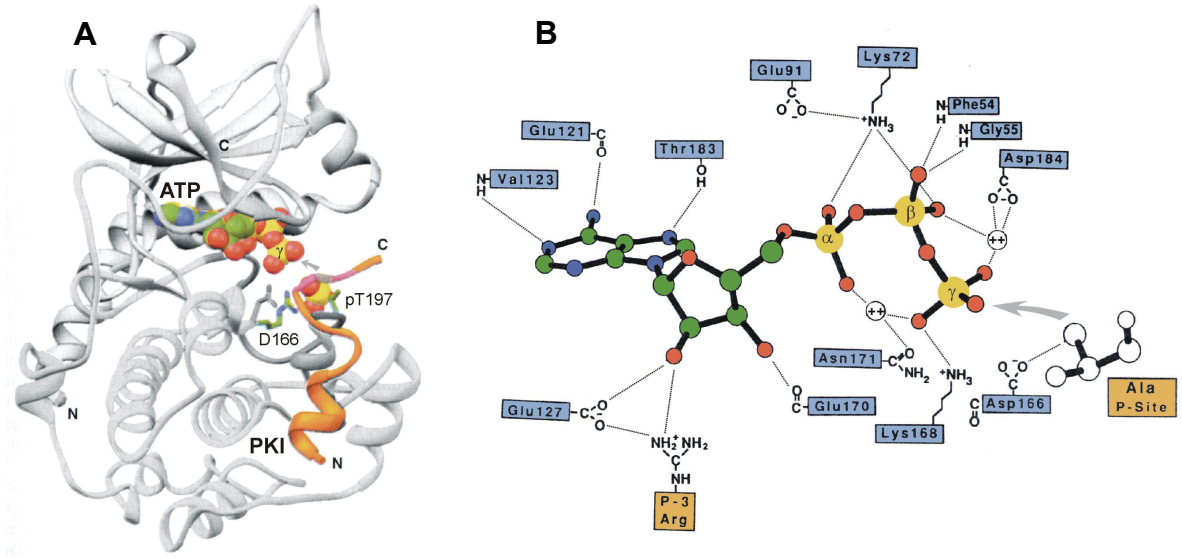


Figura 1.6. Unión de sustratos en el centro activo de la subunidad C. (**A**) Se muestra la disposición de la molécula de ATP y el péptido inhibidor PKI_{5-24} en el centro activo; se destaca también la posición de dos aminoácidos fundamentales en el proceso de catálisis: Asp^{166} en el bucle catalítico y fosfo-Thr^{197} en el bucle de activación. (**B**) Principales interacciones entre la molécula de ATP y aminoácidos del centro activo. Código de colores: C, verde; N, azul; O, rojo; P, amarillo; Mg, blanco; PKI (o residuos PKI), naranja. Adaptación de una figura original de Smith *et al.*, 1999.

El anillo de **adenina se introduce en un «bolsillo» hidrofóbico** localizado en la hendidura que hay entre los dos lóbulos formado por aminoácidos tales como Leu^{49}, Phe^{54}, Val^{57}, Ala^{70}, Val^{104}, Met^{120}, Leu^{173}, Phe^{327} y Tyr^{330}, y se ancla a la enzima a través de tres enlaces de hidrógeno: entre Val^{123} y N1 de la adenina, entre Thr^{183} y N7 de la adenina y entre Glu^{121} –localizado en el segmento de unión entre lóbulos– y el grupo amino unido al C1 de la adenina (figura 1.6B). Este último enlace es, probablemente, el más importante para discriminar el ATP de otros nucleótidos, como GTP o ITP, que carecen del grupo amino en esta posición, y explica el hecho de que la subunidad C posee una afinidad más de 1000 veces superior por ATP que por GTP (Hoppe *et al.*, 1978).

El anillo de **ribosa** se dispone en un «bolsillo» generado por los siguientes aminoácidos: Leu^{49}, Gly^{50}, Thr^{51}, Val^{57}, Glu^{127}, Glu^{170} y Leu^{173}, la mayoría de los cuales sufre un cambio de orientación una vez que el anillo de adenina ocupa su lugar. Los grupos OH 2´y 3´de la ribosa se unen a través de enlaces de hidrógeno con el Glu^{127} y el Glu^{170} de la enzima, respectivamente. Por otra parte, la Arg de la posición -3 del péptido sustrato también interacciona con el OH de la posición 3´ y con el Glu^{127} de la enzima (figura 1.6B).

Los **aminoácidos implicados en la correcta orientación de los grupos fosfato** y en la coordinación del Mg^{2+} son los siguientes: Gly^{52}, Ser^{53}, Phe^{54}, Gly^{55} –pertenecientes al bucle rico en glicinas– Lys^{72}, Lys^{168}, Asn^{171} y Asp^{184}. Otro aminoácido importante en esta función es el Glu^{91} porque, aunque no interacciona directamente con los grupos fosfato, es necesario para posicionar adecuadamente la Lys^{72}. Algunos de estos aminoácidos, concretamente los que constituyen el bucle rico en glicinas (52-55) y la Lys^{72}, sólo adoptan la orientación adecuada una vez que se ha unido el anillo de adenina. Las principales interacciones a este nivel son las siguientes: la Lys^{72}, a través de su cadena lateral, establece dos enlaces con los fosfatos α y β no transferibles del ATP y otro con la cadena lateral del Glu^{91}, necesario para su correcto posicionamiento en la estructura de la enzima; la Phe^{54} y Gly^{55} establecen sendos enlaces con el fosfato β del ATP, mientras que la Ser^{53} y la Lys^{168} interaccionan con el fosfato γ transferible. Por su parte, el Asp^{181} –situado en el bucle posicionador del magnesio– interacciona con el catión Mg^{2+} unido a los fosfatos β y γ del ATP, mientras que la Asn^{171} lo hace con el segundo catión Mg^{2+} coordinado con los fosfatos α y γ.

1.3.2.3.3. Sitio de unión del sustrato peptídico

Como se ha descrito en el apartado 1.3.1, la mayor parte de los sustratos de la PKA, tanto proteínas como péptidos sintéticos, poseen una secuencia en torno al sitio de fosforilación que se aproxima a la siguiente: **Arg**-**Arg**-X-**Ser/Thr**-Y, donde X puede ser cualquier aminoácido, e Y es normalmente un aminoácido hidrofóbico. Además de esta secuencia consenso, muchas proteínas sustrato de la subunidad C –como la propia subunidad R– o las proteínas inhibidoras –como PKI– poseen además otros determinantes que, al establecer enlaces con aminoácidos del centro activo, son responsables de la elevada afinidad con que la enzima une estas moléculas en comparación con los péptidos sintéticos de pequeño tamaño. Por esta razón, las regiones que contienen estos aminoácidos se denominan «sitios de alta afinidad» (Taylor *et al*., 1993; Kim *et al*., 2006). En el caso del PKI, estos aminoácidos son una arginina y una fenilalanina situadas, respectivamente, en las posiciones -6 y -11.

La localización de las regiones de la subunidad C implicadas en la unión del sustrato peptídico se llevó a cabo, inicialmente, mediante técnicas de marcaje químico, utilizando análogos

de los péptidos sustrato a los que se le «pegaba» algún grupo químico marcado (revisión: Taylor *et al*., 1990). Por otra parte, el cambio selectivo de algún aminoácido en la subunidad C, mediante mutagénesis dirigida, permitió identificar algunos residuos concretos de la enzima implicados en la unión del péptido (Buechler y Taylor, 1990; Gibbs y Zoller, 1991a; 1991b). Sin embargo, fue la resolución **de la estructura de rayos X de la subunidad C, formando un complejo con un péptido derivado del PKI (PKI_{5-24}) –**que contiene tanto la secuencia consenso como el sitio de alta afinidad– lo que **permitió definir con precisión** cómo tiene lugar **la unión de los sustratos peptídicos** (revisión: Smith *et al*., 1999).

La unión del péptido tiene lugar **a través de las siguientes interacciones**: (*a*) La Leu de la posición +1 del inhibidor se coloca en un «bolsillo» hidrofóbico formado por las cadenas laterales de los siguientes aminoácidos de la enzima: Leu^{198}, Pro^{202} y Leu^{205} (bucle P+1). (*b*) Las argininas de las posiciones -2 y -3 (secuencia consenso) y la arginina de la posición -6 (sitio de alta afinidad) del inhibidor establecen enlaces iónicos con residuos de ácido glutámico de la enzima, de la siguiente manera: Arg (-2) con Glu^{170} (bucle catalítico) y Glu^{230} (hélice F); Arg (-3) con Glu^{127} (segmento de unión de lóbulos); y Arg (-6) con Glu^{203} (bucle P+1). Como se ha descrito anteriormente, tanto el Glu^{127} como el Glu^{170}, también interaccionan con los grupos hidroxilo 2´y 3´de la ribosa del ATP, y por tanto actúan probablemente coordinando la unión de ambos sustratos. (*c*) La Phe de la posición -11 en el sitio de alta afinidad del péptido sustrato se localiza en un «bolsillo» hidrofóbico formado por Arg^{133}, Tyr^{235}, Pro^{236} y Phe^{239}, los tres últimos situados en el bucle que une las α-hélices F y G.

Una observación interesante es que la región de subunidad C implicada en la unión del péptido se encuentra posicionada adecuadamente para recibir el péptido antes de la unión del ATP.

1.3.2.3.4. Flexibilidad conformacional: conformación abierta y cerrada de la subunidad C

Desde hace tiempo se conoce que las proteína quinasas sufren cambios en su conformación, inducidos por la unión de los sustratos, que permiten la orientación correcta del grupo fosfato transferible y la eliminación de H_2O del centro activo (Anderson *et al*., 1979). En el caso concreto de la subunidad C, la flexibilidad conformacional se demostró mediante diferentes tipos de técnicas bioquímicas (Olah *et al*., 1993; Lew *et al*., 1997; Cheng *et al*., 1998; Herberg *et al*., 1999; Andersen *et al*., 2001), pero en los últimos años, la resolución de la estructura tridimensional de la subunidad C en diferentes etapas del ciclo catalítico permitió conocer en detalle los cambios conformacionales que ocurren en la enzima como consecuencia de la unión de los sustratos y durante la catálisis.

En estos estudios se compararon básicamente tres estructuras de la subunidad C: (*a*) en ausencia de sustratos (Akamine *et al*., 2003) o formando un complejo binario con un péptido inhibidor derivado del PKI (C–PKI_{5-22}) (Knighton *et al*., 1991a; Zheng *et al*., 1993b); (*b*) formando un complejo binario con adenosina (C–Ado) (Narayama *et al*., 1997a); y (*c*) formando un complejo ternario con el péptido inhibidor y ATP (C–ATP–PKI_{5-22}) (Zheng *et al*., 1993a), o con este péptido y un análogo no hidrolizable del ATP: el AMP-PNP (C–AMP-PNP–PKI_{5-22}) (Bossemeyer *et al*., 1993). Estas tres estructuras se corresponden, respectivamente, con una **conformación «abierta»**, una **conformación «intermedia»** y una **conformación «cerrada»** de la proteína. Por otra parte, la resolución de la estructura de la subunidad C formando un complejo con un péptido sustrato de 20 aminoácidos, Mg_2ADP y fluoruro de aluminio (C–MgADP–PS_{20}–AlF_3), que refleja la situación de la enzima durante el estado de transición, permitió descifrar el mecanismo de transferencia del fosfato desde el ATP hasta el aminoácido fosforilable del péptido/proteína sustrato (Madhusudan *et al*., 2002).

Antes de la unión de los sustratos, la subunidad C se halla en una conformación abierta. En esta situación, la His^{87} –situada al comienzo de la α-hélice C del lóbulo pequeño– se halla alejada 7.1 Å de la P-Thr^{197} –localizada en el bucle de activación del lóbulo grande; es decir, el lóbulo grande y el lóbulo pequeño se hallan dispuestos de tal forma que la hendidura entre ambos, que constituye el centro activo, se halla abierta. Por otra parte, la región 315-327 del segmento C-terminal, que cruza la hendidura del centro activo y constituye la «puerta» de entrada de la molécula de ATP, se halla desordenada, de tal manera que permite el acceso del ATP al centro activo. En esta conformación abierta, la mayoría de los aminoácidos implicados en la unión de la adenina del ATP se encuentran en la posición adecuada, formando un bolsillo hidrofóbico en el que encaja el anillo de adenina, y que es suficiente para discriminar ATP de GTP.

Una vez **unido el anillo de adenina, la subunidad C adopta una conformación intermedia**, donde tanto el bucle rico en glicinas como el lóbulo pequeño en su conjunto se hallan más próximos al lóbulo grande que en la conformación abierta. La unión de la adenina es suficiente para que varios aminoácidos, como la Lys^{72} o los que forman el bucle rico en glicinas, adopten la orientación adecuada para interaccionar con los grupos fosfato del ATP. En esta conformación, la citada región 315-324 del tallo C-terminal se reorganiza encima del centro activo, «cerrando la puerta» de entrada del ATP.

La **unión completa del ATP y del péptido induce una conformación totalmente cerrada**, en la cual el lóbulo pequeño y el lóbulo grande se hallan más próximos, de tal forma que la His^{87} del lóbulo pequeño puede establecer un enlace con el grupo fosfato de la P-Thr^{197} del bucle de activación del lóbulo grande. El bucle rico en glicinas se sitúa encima del los grupos fosfato del

ATP de tal manera que la Ser^{53} de este bucle está suficientemente próxima para establecer un enlace de hidrógeno con el fosfato γ del ATP. Esta conformación cerrada es esencial para la transferencia eficiente de fosfato desde el ATP hasta el sustrato peptídico. Una vez completado el ciclo catalítico, la enzima debe adoptar de nuevo la conformación abierta para que el MgADP pueda abandonar el centro activo.

La transición entre la conformación cerrada y abierta se produce a través de un movimiento de rotación del lóbulo pequeño con respecto al grande, a través de una o varias regiones bisagra. Aunque estudios iniciales adjudicaron este papel a la Gly^{125}, localizada en el segmento de unión de los dos lóbulos (Olah *et al*., 1993), parece ser que en este función están implicados varios aminoácidos, concretamente los que ocupan las posiciones 106, 107 y 120-126 (Tsigelni *et al*., 1999).

1.3.2.4. MECANISMO DE REACCIÓN DE LA SUBUNIDAD C

El mecanismo de reacción de la subunidad C de la PKA ha sido ampliamente estudiado. Los análisis cinéticos llevados acabo demuestran que la subunidad C fosforila el sustrato peptídico mediante un **mecanismo secuencial, que cursa con la liberación de productos de forma ordenada**, abandonando en primer lugar el centro activo el péptido sustrato y en segundo lugar el MgADP. En cuanto al orden de unión de sustratos existen algunas discrepancias: mientras algunos autores mantienen que es el MgATP el sustrato conductor (Whitehouse *et al*., 1983; Whitehouse y Walsh, 1983), otros concluyen, basándose en estudios de intercambio isotópico, que la unión de sustratos tiene lugar al azar, aunque predomina la vía en la cual se une el MgATP en primer lugar (Cook *et al*., 1982; Kong y Cook, 1988; Adams y Taylor, 1992).

Por otra parte, aunque la enzima puede utilizar varios cationes divalentes (Bhatnagar, 1983), es más eficiente en presencia de Mg^{2+}, de tal manera que el valor del número de recambio (K_{cat}) en presencia de este catión es 20 veces superior al obtenido en presencia de Mn^{2+} (Adams y Taylor, 1993).

Estudios cinéticos llevados a cabo por Grant y Adams (1996) y Lew *et al*. (1997) demostraron que **la reacción enzimática transcurre en dos fases**: una etapa rápida, que ocurre a una velocidad constante de 500 s^{-1}, correspondiente a la transferencia del grupo fosfato desde el ATP al aminoácido fosforilable, y una etapa lenta (20 s^{-1}) que corresponde a la liberación del ADP del centro activo. Estos datos concuerdan con estudios previos, en los que se había observado que los parámetros cinéticos correspondientes al estado estacionario dependen de la viscosidad del medio, lo que sugería que la velocidad del proceso catalítico está limitada por la disociación del ADP del centro activo (Adams y Taylor, 1992; 1993). Como se ha descrito en el capítulo anterior, el

transcurso de la reacción requiere cambios conformacionales en la enzima que permiten la apertura y cierre de la hendidura entre los dos lóbulos. Los datos cinéticos indican que la etapa limitante del proceso es la apertura del centro activo –transición de conformación cerrada a conformación abierta– que permite la liberación del ADP del centro activo. En resumen, la ecuación que describe el mecanismo de reacción sería la siguiente (Smith *et al*., 1999):

$$E + \text{ATP} \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + \text{ATP} + \text{S} \xrightarrow[500\text{s}^{-1}]{k_3} E + \text{ADP} + \text{P} \underset{20\text{s}^{-1}}{\overset{k_4}{\rightleftharpoons}} E$$

En base a estudio cinéticos en los que se analizaba la influencia del pH sobre el cociente K_{cat}/K_m, Yoon y Cook (1987), propusieron la hipótesis de que la reacción de transferencia del grupo fosfato transcurre a través de un **mecanismo de catálisis básica general**, en el cual **la base catalítica extrae un protón del grupo hidroxilo de la serina/treonina fosforilable, favoreciendo el ataque nucleofílico al fosfato γ del ATP**. Esta hipótesis es avalada por los datos estructurales, que adjudican el papel de base catalítica al Asp^{166}, un aminoácido conservado en la familia de las proteína quinasas, localizado en el bucle catalítico del lóbulo mayor (Knighton *et al*., 1991a). La estructura de rayos X de la subunidad C en una situación que simula el estado de transición (Madhusudan *et al*., 2002) permite observar la interacción, a través de un enlace de hidrógeno, entre este aminoácido y el grupo hidroxilo del aminoácido fosforilable del péptido sustrato. Por otra parte, el cambio de este aminoácido por Ala, en la PKA de levadura, origina una enzima mutante con un valor de constante catalítica (K_{cat}) 300 veces menor que el de la enzima normal (Gibbs y Zoller, 1991). Sin embargo, a pesar de que todos estos datos concuerdan con un mecanismo de catálisis básica general, Zhou y Adams (1997) observaron que la constante de velocidad correspondiente a la fase de transferencia del grupo fosfato es independiente del pH en un rango de 6-9, lo cual no concuerda con la participación de una base catalítica con un pK_a entre 5 y 10 como es el caso del ácido aspártico. En conclusión, el mecanismo catalítico implicado en la reacción catalizada por la subunidad catalítica de la PKA no ha sido todavía definitivamente esclarecido.

1.3.3. SUBUNIDAD REGULADORA - R

La **función primordial de la subunidad R es mantener la subunidad C en estado inactivo, en ausencia de AMPc**. La proteína ha sido purificada a partir de numerosos tejidos de mamíferos (Rannels *et al*., 1983; Robinson-Steiner *et al*., 1984; Jahnsen *et al*., 1985; Weldon *et al*., 1985; Skalhegg *et al*., 1992), invertebrados (Foster *et al*., 1984; Inoue y Yoshioka, 1997), hongos (Hixson y Krebs,

1980; Gomes, *et al*., 1983; Haq *et al*., 2000) y protozoos (de Gunzburg *et al*., 1984; Carlson y Nelson, 1996). En la mayoría de los casos, el proceso de purificación incluye una cromatografía de afinidad que utiliza como ligando el nucleótido AMPc o algún análogo del mismo, lo que permite la obtención de preparaciones homogéneas de enzima de una forma sencilla (revisión: Beebe y Corbin, 1986). En general, se trata de una **proteína dimérica** formada por dos subunidades idénticas (revisión: Taylor *et al*., 1990); la única excepción la constituyen las subunidades R de protozoos como *Dictyostelium* (de Gunzburg *et al*., 1984) o *Paramecium* (Carlson y Nelson, 1996) que son proteínas monoméricas.

1.3.3.1. ISOFORMAS DE SUBUNIDAD R

Originalmente, se separaron a partir de tejidos de mamíferos, mediante cromatografía de intercambio aniónico, dos isoformas de PKA, denominadas PKA tipo I y PKA tipo II, en función del orden de elución de una columna de DEAE-celulosa (Corbin *et al*., 1975; Hofmann *et al*., 1975). Las dos holoenzimas se diferenciaban en sus subunidades R –denominadas respectivamente subunidad R tipo I (RI) y subunidad R tipo II (RII)– que poseían diferentes propiedades físico-químicas y bioquímicas (revisión: Beebe y Corbin, 1986). La secuenciación completa tanto de RI (Titani *et al*., 1984) como de RII (Takio *et al*., 1984) procedentes de bovino, reveló las diferencias en la estructura primaria entre ambas isoformas.

En los años posteriores, el desarrollo de las técnicas de secuenciación permitió la identificación, mediante la clonación de los correspondientes ADNc, de dos nuevas isoformas de subunidad R, complicando el esquema de clasificación propuesto inicialmente. Actualmente se sabe que **en mamíferos existen cuatro tipos de subunidades R, producto de cuatro genes diferentes**; dos subunidades tipo I: **RIα** (Sandberg *et al*., 1987) y **RIβ** (Solberg *et al*., 1991), y dos subunidades tipo II: **RIIα** (Oyen *et al*., 1989) y **RIIβ** (Levy *et al*., 1988). Las referencias bibliográficas que se citan corresponden a las isoformas de la especie humana, aunque también se conocen las secuencias correspondientes a estos cuatro tipos de subunidad R procedentes de otras especies de mamíferos, que pueden ser consultadas en bases de datos como UniProtKB (The Uniprot Consortium, 2007).

Los estudios de expresión de las cuatro isoformas de subunidad R muestran que **las formas α se expresan en la mayoría de las células** (Clegg *et al*., 1988), si bien la proporción relativa de cada una varía en los diferentes tejidos; por ejemplo, RIα abunda en músculo esquelético, mientras que RIIα es la forma predominante en músculo cardíaco (Hofmann *et al*., 1975). En cambio, las isoformas β parecen ser específicas de algunas células y tejidos concretos. Así, el ARNm

correspondiente a RIβ ha sido detectado en cerebro y testículos de rata (Massa *et al*., 1990) y ratón (Clegg *et al*., 1988), y en varios tejidos humanos, mayoritariamente en cerebro (Solberg *et al*., 1991). La isoforma RIIβ ha sido purificada a partir de cerebro bovino (Weldon *et al*., 1985), y también se ha detectado en células granulosas de ovario y células de Sertoli de rata, donde su expresión está regulada hormonalmente (Janhsen *et al*., 1986; Sandberg *et al*., 1988; Oyen *et al*., 1990).

La existencia de dos **diferentes isoformas**, tipo I y tipo II, de subunidad R también se ha demostrado **en especies de invertebrados**, concretamente en *Drosophila* (Kalderon y Rubin, 1988; Parker *et al*., 2000) y en el molusco *Aplysia californica* (Bergold *et al*., 1992; Liu *et al*., 2004). En cambio, el genoma del gusano *Caernohabditis elegans* contiene un único gen que codifica una subunidad R homóloga de la isoforma RI de mamíferos (Lu *et al*., 1990).

Aunque se ha especulado mucho acerca de la necesidad de diferentes isoformas de subunidad R (revisión: Doskeland *et al*., 1993), los resultados de trabajos recientes llevados a cabo con ratones transgénicos demuestran que estas isoformas no son funcionalmente redundantes. Por ejemplo, la supresión del gen RIα es letal (Amieux y McKnight, 2002), mientras que la supresión del gen RIIβ genera ratones fenotípicamente delgados y resistentes a la obesidad inducida por la dieta (Cummings *et al*., 1996). Por el contrario, la supresión del gen RIIα en ratones no provoca estos defectos metabólicos, pero reduce la potenciación de largo plazo (LTP) en neuronas de la corteza visual (Rao *et al*., 2004).

1.3.3.2. CLASIFICACIÓN DE LAS SUBUNIDADES R

Inicialmente, las subunidades R de la PKA de cualquier origen **se clasificaban en subunidades tipo I y tipo II,** en base a sus propiedades físico-químicas: (*a*) pI y (*b*) peso molecular, y bioquímicas: (*c*) presencia de puentes disulfuro en la región de dimerización y (*d*) capacidad para ser fosforiladas por la subunidad C.

(*a*) Como hemos descrito anteriormente, las subunidades R tipo I y tipo II fueron, en principio, diferenciadas en base a la separación de las respectivas holoenzimas mediante una cromatografía de DEAE-celulosa. Esto es posible gracias a las diferencias en los valores de *pI*, que oscilan entre 6,0–6,4 para RI y 5,1–5,4 para RII (Foss *et al*., 1994).

(*b*) Las diferencias de peso molecular entre RI y RII, determinado mediante SDS-PAGE, no son tan claras. Los datos iniciales indicaban que las subunidades tipo I eran proteínas ligeramente más pequeñas –entre 2 y 5 kDa– que las tipo II, pero más tarde se comprobó que esto no ocurría en todos los casos, especialmente con las isoformas β. Además, los datos de peso molecular de las cuatro isoformas de mamíferos no siguen el mismo patrón en todas las especies; por ejemplo,

en el caso de la especie humana, el orden de las diferentes isoformas en cuanto al peso molecular de los monómeros es el siguiente: RIβ (54 kDa), RIIβ (53 kDa), RIIα (51 kDa) y RIα (49 kDa) (Skalhegg *et al*., 1992; Solberg *et al*., 1994); en cambio, en rata, la subunidad RIIα es mayor que la RIIβ (Foss *et al*., 1994).

(*c*) La mayoría de las subunidades R, con las únicas excepciones conocidas de algunos protozoos, tienen una estructura dimérica. Sin embargo, existe una diferencia a este nivel entre RI y RII: en estas últimas los dos monómeros se unen únicamente mediante enlaces no covalentes, mientras que en las primeras se establecen, además, dos puentes disulfuro, en los que participan dos cisteínas de la región N-terminal de cada monómero (Zick y Taylor, 1982; Bubis *et al*., 1987; ver estructura en apartado 1.3.3.3.1). Este hecho permite diferenciar ambas subunidades R, comparando su movilidad en una electroforesis SDS-PAGE llevada a cabo en condiciones reductoras –en presencia de β-mercaptoetanol– frente a otra realizada en ausencia del agente reductor (Solberg *et al*., 1994; León *et al*., 1997; Díaz-Enrich *et al*., 2003).

(*d*) Las subunidades R tipo II de mamíferos pueden ser fosforiladas por la subunidad C cuando ambas se encuentran formando parte de la holoenzima, en una reacción intramolecular. Esto ocurre porque la secuencia del denominado «sitio inhibidor» de RII contiene un residuo de serina fosforilable (ver estructura en apartado 1.3.3.3.2). En subunidades tipo RI, en cambio, esta serina es sustituida por alanina, y por tanto no son fosforiladas por la subunidad C cuando ambas se hallan asociadas formando la holoenzima PKA (revisión: Taylor *et al*., 1990). En consecuencia, RI y RII pueden ser fácilmente diferenciadas comprobando su fosforilación *in vitro* mediante incubación con subunidad C en presencia de [γ-^{32}P]ATP. Por otra parte, las formas fosforilada y no fosforilada de la isoforma RIIα, a diferencia de lo que ocurre con RIIβ, muestran diferente movilidad en una SDS-PAGE. Aunque las razones de este diferente comportamiento no se conocen, esta observación experimental se utiliza para clasificar una subunidad tipo II como α o β: cuando se somete una mezcla de RIIα fosforilada y no fosforilada a una SDS-PAGE se observa una doble banda (con una diferencia de 2-3 kDa), mientras que, en el caso de RIIβ, se observa una única banda (Robinson-Steiner *et al*., 1984; Skalhegg *et al*., 1992).

Recientemente, Cannaves y Taylor (2002) llevaron a cabo un análisis detallado de estos parámetros físico-químicos y bioquímicos, correspondientes a un número significativo de susbunidades R de mamíferos, invertebrados, hongos y protozoos, de las cuales se conoce su secuencia. A partir de la representación de los valores correspondientes al peso molecular teórico, deducido de la secuencia, frente a los valores de *pI*, observaron que los datos correspondientes a las subunidades R tipo I y tipo II de animales se agrupaban formando dos conjuntos bien definidos.

En cambio, los datos correspondientes a las subunidades R de hongos y protozoos, tradicionalmente consideradas como subunidades tipo II por su capacidad para ser fosforiladas por la subunidad C, se dispersaban notablemente fuera del conjunto definido por las subunidades tipo II de animales. En conclusión, la clasificación tradicional de las subunidades R, basada en los parámetros antes citados, no puede ser generalizada, puesto que sólo es adecuada para las subunidades R de animales.

Por esta razón, Cannaves y Taylor (2004) establecieron **una nueva clasificación de las subunidades R de la PKA basada en la homología de sus secuencias**. Para ello, a partir del alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a las subunidades R de estos organismos –animales, hongos y protozoos– construyeron un árbol filogenético que muestra **cuatro conjuntos bien definidos de subunidades R**: RI y RII (procedentes de animales), RIII (procedentes de hongos) y RIV (procedentes de protozoos). Dentro de los conjuntos que definen los tipos I y II de animales se diferencian claramente dos subconjuntos correspondientes a los subtipos α y β.

El análisis del árbol filogenético indica que probablemente las subunidades tipo IV –las únicas que carecen del dominio de dimerización– se originaron a partir de una subunidad R ancestral, antes de la separación de las líneas correspondientes a metazoos y hongos. Por otra parte, la separación de la línea correspondiente a los hongos –en los que existe un solo tipo de subunidad R– tuvo lugar antes de la aparición, probablemente por procesos de duplicación génica, de las subunidades tipo I y tipo II, presentes en animales. Finalmente, la existencia de un único tipo de RI y de RII en *Drosophila* y *Aplysia* sugiere que la subsiguiente duplicación génica que originó los subtipos α y β de mamíferos tuvo lugar después de la separación de las líneas correspondientes a artrópodos y moluscos.

1.3.3.3. ESTRUCTURA DE LA SUBUNIDAD R

Aunque las isoformas de subunidad R muestran ciertas diferencias estructurales y funcionales, todas ellas poseen **una misma arquitectura global**. Cada monómero de subunidad R presenta: **(*a*)** un **dominio denominado de «dimerización/acoplamiento» o D/A**, en el extremo N-terminal, seguido de **(*b*)** una **región flexible** que contiene el denominado **«sitio inhibidor»** y **(*c*)** dos **dominios de unión de AMPc** situados en tándem (figura 1.7). Esta estructura global ha sido definida gracias a las diferentes aproximaciones experimentales llevadas a cabo mediante técnicas de marcaje químico con análogos de AMPc, mutagénesis dirigida, RMN, dispersión de rayos X de ángulo pequeño, dispersión de neutrones y difracción de rayos X (revisiones: Taylor *et al*., 2005; Kim *et al*., 2006).

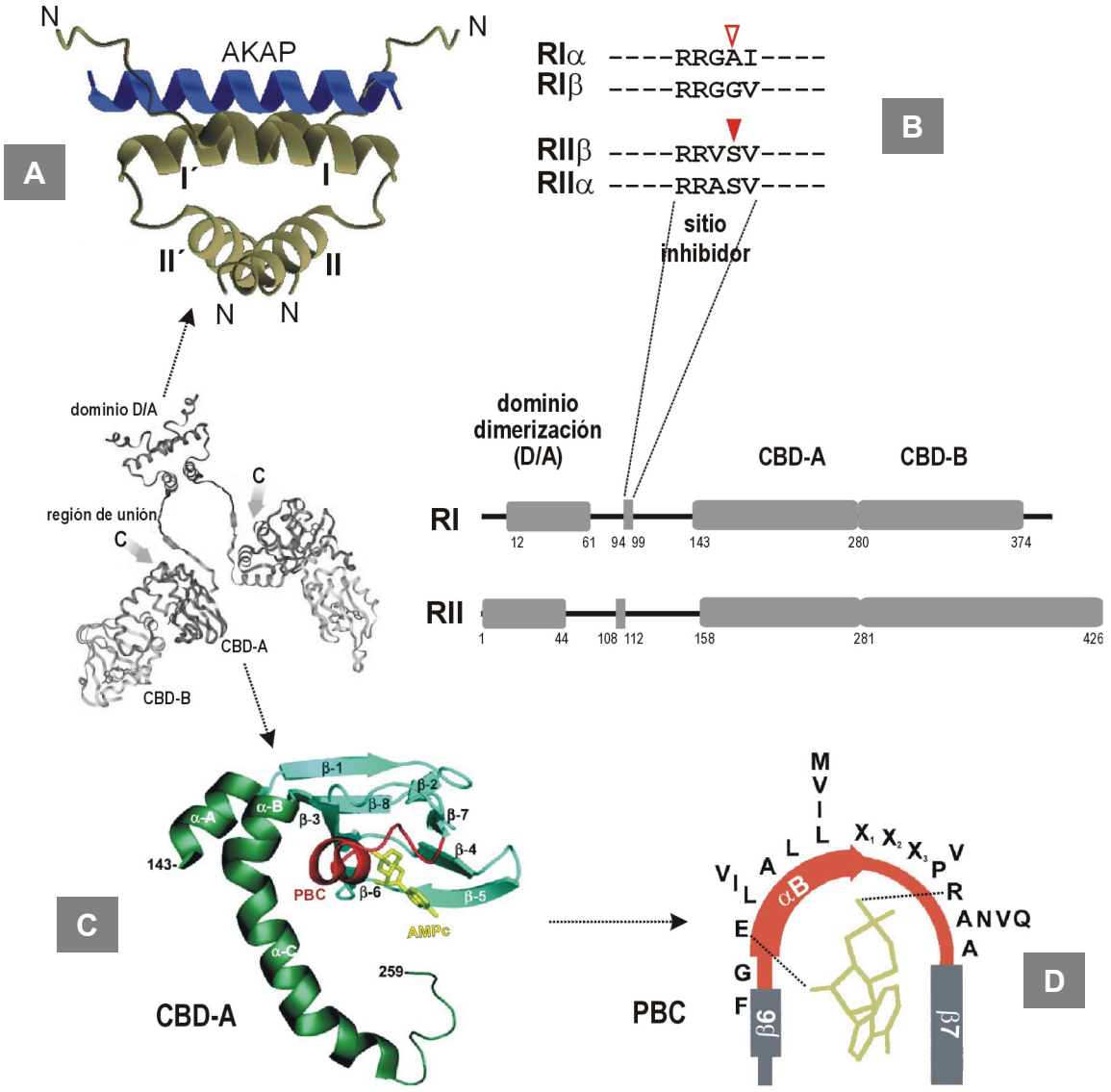


Figura 1.7. Estructura de la subunidad R. En el centro, en color gris, se muestra la estructura global de la subunidad R con los diferentes dominios (izquierda) y su correspondencia en la secuencia aminoacídica de RI y RII (derecha); las flechas de color gris en la figura de la izquierda indican las regiones de interacción con la subunidad C. (**A**) Detalle de la estructura tridimensional del dominio D/A mostrando las hélices I y II, y la región de interacción con las AKAPs a través de la hélice anfipática (en color azul). (**B**) Detalle de la secuencia correspondiente al sitio inhibidor en subunidades tipo I y tipo II. (**C**) Detalle del dominio A de unión de AMPc (CBD-A) mostrando las α-hélices A, B y C y el barril β formado por las β-hebras 1-8; en rojo se muestra el casete de unión de fosfato (PBC) y en amarillo, la molécula de AMPc. (**D**) Detalle de la secuencia correspondiente al PBC y principales interacciones con la molécula de AMPc. La figura fue construida a partir de las imágenes originales tomadas de Colledge y Scott,1999; Taylor *et al.*, 2005; Berman *et al.*, 2005; Canaves y Taylor, 2002)

1.3.3.3.1. Dominio D/A

Este dominio se localiza **en el extremo N-terminal** de la proteína –aminoácidos 12-61 en RIα y aminoácidos 1-44 en RIIα– y, como indica su nombre, es **responsable de** dos funciones: la **formación del dímero R_2** y la **interacción de este dímero con las denominadas AKAPs**, responsables de la compartimentación celular de la PKA a través de su anclaje a determinadas estructuras celulares (ver apartado 1.3.5). La importancia de este dominio en estas dos funciones fue puesta de manifiesto inicialmente mediante proteolisis parcial de la proteína (Reimann, 1986) ; más tarde, mediante mutagénesis dirigida se demostró la importancia de ciertos aminoácidos de esta región tanto en el proceso de dimerización como en la interacción con las proteínas de anclaje (Ahusen *et al*., 1994; 1996; Li y Rubin, 1995; Banca *et al*., 1998).

A pesar de las diferencias en la estructura primaria, el dominio D/A, tanto de RI como de RII, posee un **motivo estructural** común **«hélice-giro-hélice»** (Newton *et al*., 1999; 1997; Banca *et al*., 2000; Moríais *et al*., 2002). Los aminoácidos implicados en la unión a AKAPs se sitúan en la hélice I o subdominio I (aminoácidos 28-38 en RIα y 9-22 en RIIα), mientras que los residuos responsables de la dimerización se localizan en ambas hélices, aunque mayoritariamente en la hélice II o subdominio II (aminoácidos 44-58 en RIα y 28-42 en RIIα). En la estructura secundaria, los aminoácidos que constituyen tanto la hélice I como la hélice II se sitúan de tal manera que los residuos hidrofóbicos se agrupan en una de las caras, denominada cara hidrofóbica del α-hélice, mientras que los aminoácidos con carga o polares se disponen en la cara contraria de la hélice. Aunque RI y RII comparten este motivo conservado «hélice-giro-hélice», las dos isoformas se diferencian en la estructura secundaria del segmento N-terminal del dominio D/A que precede la hélice I, puesto que en RIIα los aminoácidos 1-9 forman una hebra extendida mientras que en RIα este segmento N-terminal presenta una estructura helicoidal (hélice N1) (Banca *et al*., 2000; 2003). Esta diferencia estructural podría ser responsable de la diferente capacidad que poseen RI y RII para interaccionar con AKAPs (Banca et al., 2003; Burns-Hamuro *et al*., 2006).

Los datos obtenidos mediante técnicas de RMN (Newton *et al*., 1999; Banca *et al*., 2000; 2003) muestran que, en la estructura del dímero, los dos monómeros de R se disponen formando un **motivo de dimerización** denominado **«motivo de cuatro hélices tipo X»** (figura 1.7A), presente también en otras proteínas de señalización. En esta estructura, los segmentos N-terminales y las hélices I y I´ de ambos monómeros R y R´ se disponen de forma antiparalela. Las caras hidrofóbicas de ambas hélices I y I´ forman un surco hidrofóbico que interacciona con la cara hidrofóbica de una hélice anfipática conservada en todas las AKAPs, permitiendo la unión con alta afinidad de la PKA a estas proteínas de anclaje (Newton *et al*., 2001). En el caso de la unión RIIα-AKAPs, además de

estos residuos situados en el surco hidrofóbico que forman ambas hélices I, participan también otros aminoácidos situados en el segmento N-terminal como la Ile^{3} y la Ile^{5} (Ahusen *et al*., 1994; Newton *et al*., 2001).

Por su parte, **la interfaz de dimerización está definida** también fundamentalmente por **interacciones hidrofóbicas** establecidas entre residuos que forman parte de las caras hidrofóbicas de las hélices II y II´ de ambos monómeros. En el caso de RI se establecen, además, dos puentes disulfuro intercatenarios entre la Cys^{16} –en el segmento N-terminal que precede la hélice I– y la Cys^{37} –en la hélice I– del monómero R, respectivamente, con la Cys^{37} y la Cys^{16} del monómero R´ situado de forma antiparalela (Bubis y Taylor, 1987; Banca *et al*., 2000; 2003). Sin embargo, estos enlaces disulfuro no son indispensables para mantener la estructura del dímero ya que ni su completa reducción con ditiotreitol, ni la sustitución de la Cys^{37} por His son suficientes para impedir la dimerización (León *et al*., 1997; Carlson *et al*., 2003).

1.3.3.3.2. Región de unión flexible

La denominada región de unión flexible está formada por los aminoácidos 62-143 en RIα y 45-158 en RIIα, y **conecta el dominio D/A con los dos dominios de unión de AMPc** (figura 1.7) (revisión: Taylor *et al*., 2005). Esta región **contiene el denominado «sitio inhibidor»**, una secuencia similar a la secuencia consenso de los sustratos de la PKA, que se acopla al centro activo de la subundad C cuando ambas unidades –R y C– se hallan formando la holoenzima; de esta manera, en ausencia de AMPc, la PKA se mantiene en estado inactivo, dado que el centro activo no puede ser ocupado por otras proteínas sustrato.

La secuencia del sitio inhibidor está conservada en todas las isoformas de subunidad R y, como es lógico, contiene los determinantes de especificidad de los sustratos de la PKA, es decir, dos argininas en las posiciones -3 y -2 y un aminoácido hidrofóbico en la posición +1. Sin embargo, esta secuencia tiene un elemento que **diferencia las subunidades tipo I de las tipo II** (figura 1.7B). En RII, el sitio inhibidor contiene una serina fosforilable en la posición 0 (Takio *et al*., 1984); por esta razón, las subunidades R tipo II son fosforiladas por la subunidad C, en una reacción intramolecular, cuando ambas se hallan asociadas formando la holoenzima PKA. En este caso, el sitio inhibidor también se denomina «sitio de autofosforilación» o «secuencia sustrato». La fosforilación de RII es importante desde el punto de vista funcional, ya que reduce notablemente la capacidad de unión a la subunidad C; en otras palabras la PKA tipo II es más sensible a la activación por AMPc cuando su subunidad R se halla fosforilada (Rangel-Aldao y Rosen, 1977).

En las subunidades tipo I, en cambio, la serina fosforilable es sustituida por alanina o glicina, y en consecuencia, estas isoformas no son fosforiladas por la subunidad C (Titani *et al*., 1984; revisión: Taylor *et al*., 1990). En este caso, el sitio inhibidor se denomina «secuencia pseudosustrato», que también está presente en la proteína inhibidora PKI (Walsh *et al*., 1990). La asociación de las subunidades R tipo I con la subunidad C no es dependiente de la fosforilación de R sino de la presencia de MgATP, ya que el nucleótido favorece la reasociación de ambas subunidades, y en consecuencia aumenta la concentración de AMPc necesaria para disociar la holoenzima (Ogreid y Doskeland, 1983).

A diferencia del sitio inhibidor, el resto de la secuencia de la región de unión está poco conservada en las diferentes isoformas de subunidad R; de hecho **es la zona más variable y más antigénica de la proteína**. La estructura obtenida mediante difracción de rayos X de una subunidad R tipo Iα recombinante, carente de la región N-terminal (rRIα Δ1-91) muestra que la región de unión posee una estructura desordenada, y por tanto no visible en la estructura tridimensional (Su *et al*., 1995) Los estudios más recientes muestran que esta región es, probablemente, la **responsable de las notables diferencias en la forma global que adoptan las distintas isoformas de subunidad R**, tanto aisladas como asociadas a la subunidad C, puesto que puede mediar diferentes ordenamientos espaciales del dominio D/A y de los dominios de unión de AMPc. Por ejemplo, el dímero de RIα, en su conjunto, adopta una forma de «Y», bastante compacta, donde los brazos de la «Y» corresponderían a los dominios de unión de AMPc (Heller *et al*., 2004). Por el contrario RIIα muestra una forma mucho más extendida, a modo de barra de pesas, en la que los dominios de unión del nucleótido se sitúan en los extremos de la barra (Vigil *et al*., 2006a). Dado que la región de unión contiene diferentes sitios de fosforilación potenciales, así como dominios de unión SH3, es probable que la forma global que adopta el dímero R_2 esté regulada mediante mecanismos todavía no conocidos que afecten a la conformación de esta región (Taylor *et al*., 2005).

1.3.3.3.3. Dominios de unión de AMPc

La subunidad R de la PKA es el principal receptor de AMPc en eucariotas. Los estudios iniciales, utilizando AMPc –o bien análogos del mismo– marcado radiactivamente, indicaban una estequiometría de unión de 2 moles AMPc/mol R (Corbin *et al*., 1978; Kerlavage y Taylor, 1980), que sugería la existencia de dos sitios de unión para el nucleótido en cada monómero de subunidad R. La determinación de la secuencia aminoacídica tanto de RI (Titani *et al*., 1984) como de RII (Takio *et al*., 1984) demostró, no sólo la existencia de **dos dominios de unión de AMPc**, sino también que ambos se originaron mediante **duplicación génica**, antes de que se separasen las

isoformas RI y RII en la línea evolutiva. Una vez conocida la estructura primaria, los estudios de proteolisis limitada y de marcaje con 8-azido-AMPc permitieron determinar con mayor precisión los aminoácidos fundamentales implicados en la unión del nucleótido (Ogreid *et al*., 1989; Shabb *et al*., 1995).

Cada monómero de subunidad R posee dos dominios de unión de AMPc (CBD, «*c*AMP-*b*inding *d*omain») denominados **dominio A** y **dominio B**, que se sitúan de forma contigua, constituyendo la parte C-terminal de la proteína (figura 1.7). **Cada dominio posee un centro de unión para AMPc**, y a pesar de que ambos poseen un elevado grado de homología en sus secuencias, no son funcionalmente idénticos, y pueden ser diferenciados cinéticamente en base a su afinidad por derivados del AMPc o por las constantes de disociación del nucleótido (Rannels y Corbin, 1980; Ogreid *et al*., 1989).

En el año 1995, se determinó la estructura de rayos X de una subunidad RIα recombinante, carente de la región N-terminal (rRIα Δ1-91), pero que contiene ambos dominios de unión de AMPc (Su *et al*., 1995); más recientemente se resolvió también la estructura de una subunidad tipo RIIβ, carente asimismo del dominio de dimerización (Diller *et al*., 2001). Ambas estructuras muestran un plegamiento común y característico para cada CBD, aunque la orientación del dominio B con respecto al A es bastante diferente en ambas isoformas (Diller *et al*., 2001).

Cada **CBD** es un pequeño módulo de aproximadamente 120 aminoácidos, cuya estructura característica está formada por un **barril β con forma de cesta** (constituido por ocho hebras β) y un **subdominio helicoidal de tres α-hélices**, denominadas αA (antes de la β-hebra 1) y αB y αC (situadas a continuación de la β-hebra 8) y que constituyen la parte C-terminal de cada dominio (ver figura 1.7C). Esta estructura característica también está presente en el dominio de unión de AMPc de la proteína CAP («*c*atabolite *a*ctivator *p*rotein») de *E. coli*, que promueve la transcripción del operón *lac* en respuesta al nucleótido (Weber *et al*., 1987).

En la base de la cesta que forma cada barril β, la región entre las β-hebras 6 y 7, forma un motivo estructural, altamente conservado en todas las subunidades R, denominado **casete de unión de fosfato** o **PBC** («*p*hosphate *b*inding *c*assette»), **implicado directamente en la unión del AMPc** y en su protección frente a la hidrólisis por las fosfodiesterasas celulares.

La secuencia característica del PBC –tanto del dominio A como del B– que se muestra en la figura 1.7D, es la región más conservada entre todas las subunidades R de diferentes especies, y es suficiente para clasificar inequívocamente una proteína como subunidad R de la PKA, diferenciándola de otros miembros de la superfamilia de proteínas que unen nucleótidos cíclicos, como la proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) o la proteína CAP de *E. coli* (Canaves y

Taylor, 2002). La **secuencia de cada PBC contiene**, en un entorno de aminoácidos hidrofóbicos, **dos residuos con carga: el ácido glutámico de la posición 3 y la arginina de la posición 13, que son esenciales en la unión del AMPc**. Ambos establecen sendos enlaces de hidrógeno con el OH 2´de la ribosa y con un oxígeno del grupo fosfato respectivamente. (Diller *et al*., 2001; Canaves y Taylor, 2002; Berman *et al*., 2005). De acuerdo con los datos estructurales, la importancia de estos dos aminoácidos en la unión de AMPc fue puesta de manifiesto mediante la introducción de mutaciones puntuales en la subunidad R; por ejemplo, la sustitución de la Arg^{209}, situada en el PBC-A de RI, por Lys impide la unión del AMPc al sitio A (Bubis *et al*., 1988).

Por otra parte, el aminoácido que ocupa la posición 14 del PBC es fundamental para determinar la especificidad para un determinado nucleótido cíclico. La presencia de alanina o treonina en esta posición hace que la PKA o la PKG sean selectivas para AMPc y GMPc respectivamente (Weber *et al*., 1989); la razón es que la treonina en esta posición puede establecer un enlace de hidrógeno adicional con el grupo amino de la posición 2 del anillo de guanina del GMPc (Shabb *et al*., 1991). Aunque en la mayoría de la subunidades R esta posición la ocupa un residuo de alanina, en algunas especies de hongos y levaduras este aminoácido en el PBC-B está sustituido por valina, asparagina o glutamina (Canaves y Taylor, 2002), y curiosamente existen datos bioquímicos que indican que estas subunidades R pueden ser activadas tanto por AMPc como por GMPc (Cytrynska *et al*., 1999).

Finalmente, fuera del PBC, el anillo de adenina del AMPc se dispone en una especie de «sandwich» hidrofóbico, estableciendo dos enlaces con sendos aminoácidos situados cada uno en una cara del «sandwich». En el caso de RIα, el anillo de adenina del AMPc unido al sitio A interacciona con la Val^{182} (β-hebra 4 del dominio A) y con el Trp^{260} (α-hélice A del dominio B), mientras que en el anillo de adenina del AMPc unido al sitio B lo hace con la Val^{300} (β-hebra 4 del dominio B) y con la Tyr^{371} (α-hélice C del dominio B) (Su *et al*., 1995; Berman *et al*., 2005).

1.3.4. HOLOENZIMA PKA – COMPLEJO $R_2$2C

1.3.4.1. ESTRUCTURA COMPLEJO RC

Recientemente se ha determinado la **estructura cristalográfica**, mediante difracción de rayos X, de **un complejo formado por la subunidad C con una subunidad R recombinante rRIα (91-244)** (Kim *et al*., 2005). A pesar de carecer del dominio de dimerización N-terminal y del CBD-B, esta subunidad R mantiene su capacidad para unir con alta afinidad la subunidad C, así como AMPc, a través del CBD-A (Huang y Taylor, 1998).

Los datos estructurales obtenidos revelan que existen **tres sitios básicos de interacción entre R y C**: (*a*) hendidura del centro activo de la subunidad C – sitio inhibidor de la subunidad R, (*b*) α-hélice G de la subunidad C – PBC del dominio A de la subunidad R, y (*c*) bucle de activación de la subunidad C – α-hélices B y C del dominio A de la subunidad R (figura 1.8A).

(a) El **sitio inhibidor de RIα** (secuencia: Arg-Arg-Gly-Ala-Ile), localizado en la región de unión flexible de la subunidad R, **se acopla en la hendidura que constituye el centro activo de la subunidad C**. Como era predecible, las interacciones generadas son idénticas a las que ocurren cuando el centro activo es ocupado por el péptido inhibidor PKI_{5-24}, reveladas en la estructura de rayos X del complejo C–PKI_{5-24} (Knighton *et al*., 1991a; 1991b), y que hemos descrito en el apartado 1.3.2.3.3. Básicamente, la isoleucina de la posición +1 se sitúa en un «bolsillo» hidrofóbico formado por las cadenas laterales los aminoácidos de la enzima que forman el bucle P+1, y las argininas de las posiciones -3 y -2 establecen enlaces iónicos respectivamente con el Glu^{127}, situado en el segmento de unión de ambos lóbulos de C, y con el Glu^{230}, situado en la α-hélice F.

(b) La Tyr^{247}, situada en la prominente α-hélice G de la subunidad C se halla rodeada de aminoácidos hidrofóbicos que generan una superficie de contacto con una zona hidrofóbica del PBC de la subunidad R. En esta interfaz hidrofóbica generada entre ambas subunidades, la **Tyr^{247} de la α-hélice G de la subunidad C establece una fuerte interacción directa con la Tyr^{205} situada en el centro del PBC** del dominio A de la subunidad R (ver figura 1.8A).

(c) El **bucle de activación de la subunidad C interacciona directamente con la región helicoidal formada por las α-hélices B y C del CBD** de la subunidad R. Los residuos que contribuyen principalmente a esta interacción son la Arg^{194}, el Trp^{196} y la Thr^{197} de la subunidad C, y la Met^{234}, la Arg^{230} y la Arg^{241} de la subunidad R. Este tercer sitio de interacción reveló de nuevo la múltiple importancia funcional del bucle de activación de la subunidad C, en el que se encuentra la P-Thr^{197}, cuyo papel fundamental para la conformación catalíticamente activa de la enzima había sido previamente demostrado. El trabajo de Kim *et al*. (2005) indica que la fosforilación de la Thr^{197} también genera un sitio de unión para la subunidad R, lo que concuerda con la reciente observación de que la unión de RIα a la subunidad C es menos eficiente cuando la Thr^{197} no está fosforilada (Iyer *et al*., 2005).

La observación de la arquitectura global del complejo C–RIα (Kim *et al*., 2005), y su comparación con las estructuras individuales de la subunidad C (Knighton *et al*., 1991a; 1991b) y de la subunidad R recombinante rRIαΔ1-91 con AMPc unido (Su *et al*., 1995), permite observar los cambios conformacionales que sufren ambas subunidades en la formación del complejo R–C. Los datos muestran que, mientras la subunidad C sufre mínimos cambios en su estructura

tridimensional –se halla en conformación cerrada como consecuencia de la unión de MgATP en su centro activo– la **subunidad R cambia notablemente su conformación como consecuencia de su unión a la subunidad C** (Vigil *et al.*, 2005; revisiones: Taylor *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006).

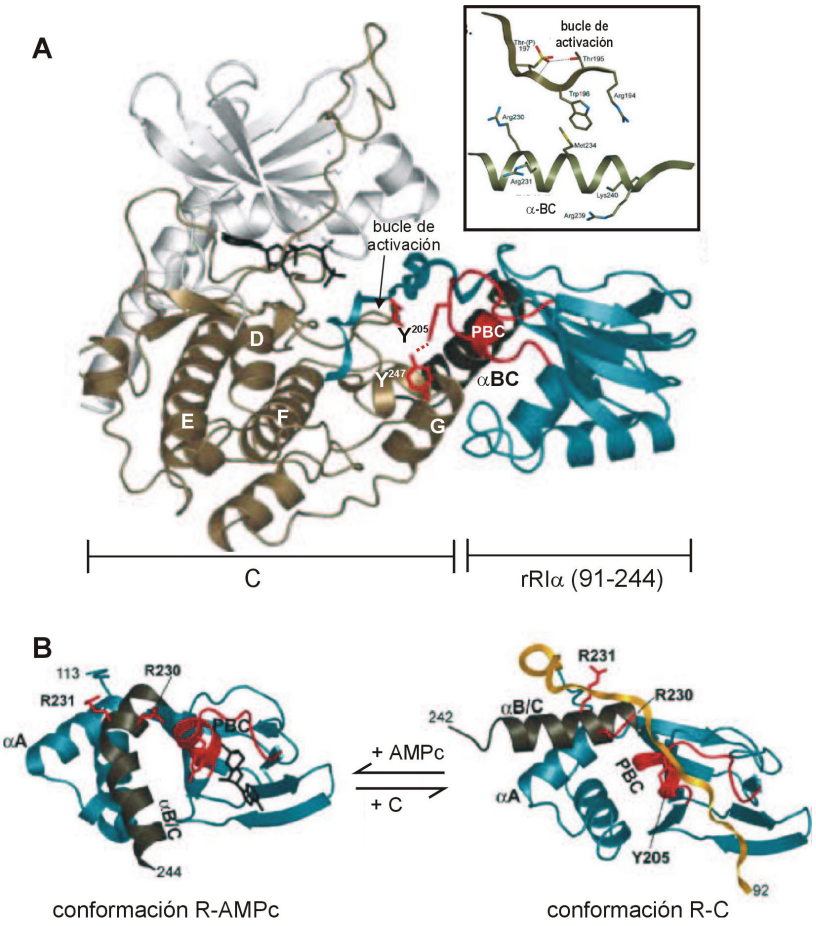


Figura 1.8. (**A**) Interacciones entre la subunidad C y la subunidad R deducidas a partir de la estructura tridimensional de un complejo RC. Se muestra la localización del sitio inhibidor de R en la hendidura del centro activo de C y la interacción entre Tyr^{247} de subunidad C con Tyr^{205} del PBC (rojo) de la subunidad R. En el inserto se muestra la interacción entre aminoácidos del bucle de activación de la subunidad C con aminoácidos de la α-B/C de la subunidad R (**B**) Cambios conformacionales en la subunidad R inducidos por la unión de AMPc o por la subunidad C. Obsérvese el cambio en la posición de las α-B/C (negro) y del PBC (rojo); la región de unión flexibe (amarillo) se halla desordenada en la conformación R-AMPc y no se observa en la estructura 3D. La figura es una adpatción de la figura original de Susan Taylor en la revista electrónica ALS Science (2005) vol. 258.

Las dos principales diferencias entre la conformación de la subunidad R asociada a la subunidad C (conformación R–C) y la conformación de la subunidad R con AMPc unido (conformación R–AMPc) se muestran en la figura 1.8B. En primer lugar, la región de unión flexible, que en la conformación R–AMPc se halla desordenada, se vuelve ordenada en la conformación R–C para situarse en la hendidura del centro activo de la subunidad C. En segundo lugar, las α-hélices B y C del dominio A, que en la conformación R-AMPc se hallan dispuestas formando un ángulo, constituyen una única α-hélice completamente extendida en la conformación R–C, proporcionando una mayor superficie de interacción con el bucle de activación de la subunidad C. Esta nueva disposición de las α-hélices B/C se produce gracias a un desplazamiento de aproximadamente 90º del extremo C-terminal de la α-hélice C. Dado que esta α-hélice conecta ambos dominios CBD-A y CBD-B es probable que su desplazamiento conlleve un cambio en la

posición del dominio B con respecto al A; este cambio predecible no puede ser apreciado en la estructura de rayos X del complejo, dado que la subunidad RIα (91-244) carece del dominio B. Sin embargo, los análisis de simulación computacional llevados a cabo parecen confirmar la predicción de que la formación del complejo R–C conlleva cambios conformacionales importantes también en el CBD-B, y en su orientación con respecto al A (Gullingsrud *et al*., 2006).

Como hemos descrito en el apartado 1.3.3.3, los datos estructurales obtenidos mediante RMN o difracción de rayos X, muestran que las diferentes isoformas de subunidad R comparten motivos estructurales, tanto en el dominio D/A como en los dominios de unión de AMPc. Desafortunadamente, la existencia de regiones de la subunidad R con una estructura desordenada –como la región de unión flexible entre el dominio D/A y los dominios CDB– hace extremadamente difícil resolver, mediante difracción de rayos X, la estructura global de las diferentes isoformas de la proteína y de sus correspondientes holoenzimas.

Este problema se ha solucionado parcialmente utilizando técnicas de dispersión de rayos X de ángulo pequeño (SAXS) que, aunque no permiten obtener detalles estructurales de los dominios, aportan información acerca de la arquitectura global de las subunidades R, solas o unidas a la subunidad C. Los datos obtenidos de estudios llevados a cabo recientemente revelan **notables diferencias en la estructura o forma global de las holoenzimas constituidas con las diferentes isoformas de subunidad R** (Vigil *et al*., 2005; 2006a). Así por ejemplo, la holoenzima formada por la isoforma RIα posee una forma alargada; en esta estructura la subunidad C contacta con el sitio inhibidor y con el CBD-A, mientras que el CBD-B queda fuera de esta superficie de contacto y expuesto al solvente. En contraste, la holoenzima correspondiente a la isoforma RIIα adopta una forma extendida en la cual la subunidad C contacta con el sitio inhibidor y con ambos dominios A y B de unión de AMPc. Por su parte, la holoenzima formada por la isoforma RIIβ posee una forma globular mucho más compacta, a pesar de que en ausencia de subunidad C adopta, al igual que RIIα, una forma extendida.

Estas diferencias en la arquitectura global de las diferentes holoenzimas de PKA resultan, hasta cierto punto, sorprendentes dada la homología de secuencia y la similar organización estructural, formada por los mismos dominios, que poseen las distintas isoformas de subunidad R. Los datos de SAXS muestran que estas diferencias en la forma global de las holoenzimas son debidas, probablemente, a las diferencias estructurales en la región de unión flexible de la subunidad R, que origina una diferente organización espacial de los dominios D/A y CBD (Vigil *et al*., 2006a).

1.3.4.2. MECANISMO DE ACTIVACIÓN DE LA PKA POR AMPC

Tal como revela la estructura cristalográfica del complejo R–C, descrita en el apartado anterior, la PKA se mantiene en estado inactivo porque el centro activo de las subunidades C se encuentra ocupado por el denominado sitio inhibidor de las subunidades R.

El proceso de activación de la PKA comienza cuando una señal extracelular interacciona con su receptor de membrana en la célula diana, y produce una activación de la adenilato ciclasa. El consecuente incremento transitorio de los niveles de AMPc y la unión del nucleótido a las subunidades R, provoca, a través de un mecanismo alostérico, cambios conformacionales que inducen la disociación de la holoenzima PKA en un dímero R_2 y dos subunidades C monoméricas y activas, puesto que su centro activo puede ser ocupado ahora por diferentes sustratos peptídicos.

La **unión del AMPc a la subunidad R se produce de forma progresiva**, al menos en la isoforma RIα. El nucleótido se une en primer lugar al sitio B, en el CBD-B, único sitio accesible en el complejo $R_2$2C. La unión de esta primera molécula de AMPc y el consiguiente cambio conformacional en la subunidad R permite el acceso de una segunda molécula de AMPc al sitio A, en el CBD-A, que causa la disociación completa de la holoenzima. Es decir, la unión del AMPc al dominio A es directamente responsable de la activación de la PKA, mientras que su unión al dominio B sólo sirve para regular el acceso del nucleótido al dominio A (Herberg *et al*., 1996). Este mecanismo concuerda con los resultados de los estudios cinéticos que muestran una cooperatividad positiva en la unión del AMPc a la subunidad R en el complejo $R_2$2C (Ogreid *et al*., 1983; Doskeland *et al*., 1993).

La comparación de las estructuras cristalográficas de la subunidad R con AMPc unido (Su *et al*., 1995) y del complejo R–C (Kim *et al*., 2005) permite observar los grandes cambios conformacionales que sufre la subunidad R cuando pasa de una situación a otra. Sin embargo, dado que no se ha resuelto todavía la estructura de rayos X de la subunidad R sola y libre de AMPc (Apo-R), no es posible deducir si dichos cambios conformacionales son debidos a la liberación del nucleótido o a la unión de la subunidad C. En definitiva, hasta la fecha no se conoce con precisión el mecanismo molecular mediante el cual el AMPc produce la activación alostérica de la PKA; en otras palabras, **no se conoce todavía cómo se transmiten los cambios generados localmente por la unión del AMPc en el sitio A a las zonas de la subunidad R que interaccionan directamente con la subunidad C**. Sin embargo, muy recientemente se han aportado algunos datos estructurales obtenidos mediante técnicas de RMN, que permiten proponer un modelo de activación (Vigil *et al*., 2006b; Das *et al*., 2007). Según este modelo, la α-hélice C del dominio de unión de AMPc es un elemento clave para propagar la señal desde el sitio de unión del nucleótido (PBC) hasta las

regiones de la subunidad RIα que interaccionan con la subunidad C, y se han identificado dos enlaces iónicos que actuarían como **interruptores electrostáticos** en la transmisión de estos cambios. Estos enlaces se establecen entre el Glu^{200} y la Arg^{209} –localizados en el PBC–con la Arg^{241} y el Asp^{170} respectivamente, y conectan el PBC –lugar de unión del AMPc– con la β-hebra 3 y con la α-hélice C. La unión del AMPc al PBC provoca la ruptura de estos enlaces provocando un cambio en la posición de la α-hélice C, que constituye uno de los elementos de la subunidad R que establece contactos con la subunidad C. En consecuencia, el cambio de su posición altera la interacción R-C y provoca la disociación de ambas subunidades.

En cualquier caso, para esclarecer de forma precisa el mecanismo molecular de activación alostérica de la PKA sería preciso resolver la estructura cristalográfica de la subunidad R libre de AMPc.

1.3.5. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA PKA

La PKA tipo I, que contiene RIα o RIβ como subunidad R, es una proteína predominantemente citosólica, mientras que la PKA tipo II (RIIα o RIIβ) se asocia mayoritariamente con fracciones subcelulares particuladas (Scott, 1991). Esto es debido a que **las subunidades R tipo II** se unen con alta afinidad (rango de nM) a unas **proteínas específicas**, denominadas **AKAPs**, que **anclan la PKA tipo II a determinadas estructuras celulares**, como citoesqueleto, mitocondrias, membranas, etc. A pesar de que la mayoría de las AKAPs caracterizadas hasta el momento son específicas para subunidades RII, existen algunas, denominadas D-AKAPs («*d*ual-AKAPs»), que pueden unir también subunidades RI, aunque con una afinidad 25-500 veces inferior en comparación con RII (Huang *et al*., 1997a; 1997b; Wang *et al*., 2001). Por tanto, no se puede descartar que algunas AKAPs puedan mediar también el anclaje de la PKA tipo I a determinadas estructuras celulares.

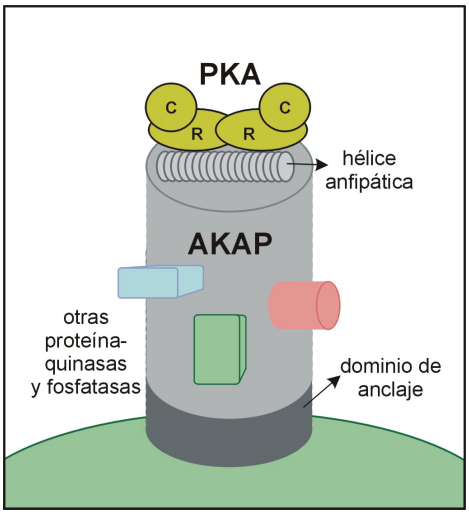
Las primeras AKAPs fueron **identificadas en la década de 1980** como proteínas contaminantes en los procesos de purificación de las subunidades RII α y RIIβ (Theurkauf y Vallee, 1982; Lohmann *et al*., 1984; Sarkar *et al*., 1984). Actualmente, se conocen en mamíferos más de 50 miembros de esta familia de proteínas (revisión: Taskén y Aandahl, 2004) y su presencia ha sido demostrada también en invertebrados, como *Drosophila* (Han *et al*., 1997; Li *et al*., 1999) o el nematodo *Caenorhabditis* (Angelo y Rubin, 1998). En este último caso, curiosamente, se trata de una proteína ($AKAP_{CE}$) que interacciona específicamente con una subunidad R tipo I, la única presente en el gusano, y no reconoce las isoformas RIIα ni RIIβ de mamíferos.

En los 25 años transcurridos desde su descubrimiento, las AKAPs han sido objeto de numerosas e interesantes investigaciones que han llevado al conocimiento de los elementos

estructurales implicados en su interacción tanto con la subunidad R como con estructuras celulares; estos estudios también han demostrado la implicación clave de estas proteínas en la **regulación de numerosos procesos fisiológicos** tales como la función cardiovascular, la biosíntesis de esteroides, la función reproductiva –a través de la motilidad de espermatozoides– el metabolismo de adipocitos, la secreción de insulina o la respuesta inmune (revisión: Taskén y Aandahl, 2004).

Aunque estructuralmente diversas, todas **las AKAPs son funcionalmente muy parecidas** y comparten su capacidad de unión, con alta afinidad (1-50 nM), a la PKA tipo II. Esta unión se produce a través de la interacción del dominio de dimerización/acoplamiento N-terminal de la subunidad R con la cara hidrofóbica de una **α-hélice anfipática** formada por 14-18 aminoácidos, que es un elemento estructural común en todas AKAPs –ver apartado 1.3.3.3 y figura 1.7A (Carr *et al*., 1991; 1992; Newton *et al*., 1997; 1999). Por otra parte, cada AKAP posee un **«dominio diana»**, el cual, mediante interacciones proteína-proteína o proteína-lípido (figura 1.9), permite el anclaje del complejo AKAP-PKA a determinados orgánulos o estructuras celulares. Lógicamente, este dominio diana es específico de cada AKAP, en función del lugar de anclaje dentro de la célula (Dell´Aqua *et al*., 1998; Trotter *et al*., 1999; Wong y Scott, 2004).

Figura 1.9. Esquema general de una AKAP. Se muestra el dominio de unión a PKA (α–hélice anfipática cuya cara hidrofóbica interacciona con la subunidad reguladora de la PKA), el dominio diana de anclaje a orgánulos celulares y los sitios de unión para otras moléculas de señalización que permiten la formación de complejos multienzimáticos.



Hasta la fecha han sido identificadas: (*a*) AKAPs asociadas a canales iónicos: (AKAP79, asociada a receptores AMPA; AKAP15/8, asociada a canales de calcio tipo L; AKAP yotiao, asociada a receptores NMDA); (*b*) AKAPs asociadas a elementos del citoesqueleto (WAVE1, AKAP-Lbc y gravina , asociadas a actina; MAP2, asociada a microtúbulos; AKAP450, pericentrina y hAKAP220, asociadas a centrosomas); (*c*) AKAPs asociadas a mitocondrias (Wave1, D-AKAP-1 y

Rab-32) y (*d*) AKAPs implicadas en la regulación de la dinámica nuclear y en la condensación de la cromatina (AKAP95, mAKAP) (revisiones: Taskén y Aandaahl, 2004; Langeberg y Scott, 2005).

En el año 1994, John D. Scott y colaboradores descubrieron que la AKAP79, localizada en las densidades postsinápticas, podía unir específicamente, además de la PKA, la proteína fosfatasa 2A o calcineurina, y aislaron, a partir de cerebro bovino, un complejo proteico formado por las tres proteínas (Coghlan *et al*., 1995a; 1995b). Las investigaciones llevadas a cabo a partir de este descubrimiento pusieron de manifiesto que la mayoría de las AKAPs pueden interaccionar y unir específicamente, además de la PKA, otras proteínas de señalización, como proteína fosfatasas, fosfodiesterasas u otras proteína quinasas diferentes a la PKA (revisiones: Smith *et al*., 2006; McConnachie *et al*., 2006). Esta importante característica hace que actualmente **se consideren las AKAPs como verdaderos andamios moleculares** que, además de conferir especificidad espacial a la PKA dentro de la célula, facilitan la integración de procesos de fosforilación y defosforilación e incluso **la integración de diferentes vías de señalización intracelular**, mediante el anclaje conjunto de diferentes proteínas efectoras a estructuras celulares, en proximidad con sus sustratos. Según los expertos, es posible que estemos todavía en el comienzo de entender el papel de las AKAPs en la organización de los eventos de señalización intracelular.

1.4. El mejillón *Mytilus* como modelo experimental

1. 4. 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL MEJILLÓN

El mejillón presente en las rías gallegas pertenece al género *Mytilus*, identificado por Linneo en 1758. Aunque inicialmente fue clasificado como *Mytilus edulis* o mejillón atlántico, los estudios realizados en los últimos años sobre sus características morfológicas y genéticas permiten concluir que se trata de la especie *Mytilus galloprovincialis* o mejillón mediterráneo identificado por Lamarck en 1819 (Crespo, 1988; Sanjuan, 1992; Sanjuan *et al*., 1986; 1990; 1994), y se clasifica de acuerdo con la siguiente sistemática[1]:

Phylum	*Mollusca*
Clase	*Bivalvia*
Subclase	*Lamellibranchia*
Superorden	*Pteriomorphia (Filibranchia)*
Orden	*Mytiloida*
Familia	*Mytilidae*
Género	*Mytilus*
Especie	*galloprovincialis*
Nombre común	*Mejillón mediterráneo*

[1]Fuente: NCBI Taxonomy Database; ID: 29158
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Taxonomy)

Se trata de un molusco bivalvo sésil que vive en aguas litorales y sublitorales poco profundas y que preferentemente se asienta en zonas de corrientes, adherido a sustratos resistentes como rocas, guijarros etc. Por su localización litoral está expuesto a las condiciones típicas de vida intermareal, en la cual uno de los principales condicionantes es la exposición periódica al aire durante la marea baja.

En Galicia, los mejillones se cultivan fijados sobre cuerdas, que penden de unas plataformas flotantes, denominadas bateas, localizadas en las rías. Esta forma de cultivo presenta numerosas ventajas con respecto a otros métodos; entre ellas podemos destacar la mayor disponibilidad de alimento o el mejor aprovechamiento del espacio de cultivo.

1. 4.2. EL MEJILLÓN Y SU IMPORTANCIA EN LA ECONOMÍA DE GALICIA

La miticultura es una de las actividades sociales y económicas más importantes en la Galicia costera. La producción media del mejillón se ha mantenido en los últimos años en valores que oscilan entre 270.000 y 300.000 toneladas.

Según los datos de la FAO, en todo el mundo se producen aproximadamente 1.500.000 toneladas de mejillón al año, de las cuales, la Unión Europea produce en torno a 600.000 toneladas, el 40 % de la producción mundial. **Galicia ocupa el primer puesto europeo en la producción de este molusco** –por delante de países como Holanda, Dinamarca, Francia e Italia– concentrando la mitad de toda la producción de la UE, y el segundo puesto a nivel mundial, sólo superada por China.

Otros datos que avalan la importancia de la miticultura en Galicia son la presencia de aproximadamente 3.300 bateas instaladas en las rías gallegas y la utilización de más de 1.000 embarcaciones auxiliares de acuicultura. Además, la actividad económica en torno al cultivo del mejillón en Galicia no se restringe solamente a la producción del molusco. Para tener una visión suficientemente amplia de la repercusión del cultivo del mejillón, hay que considerar otros sectores estrechamente vinculados. En primer lugar, las empresas proveedoras, que facturan anualmente 8 millones de euros y que proporcionan empleo a unas 530 personas. En segundo lugar, las plantas depuradoras, con una facturación anual de 87 millones de euros y que generan empleo para unas 400 personas. En tercer lugar, los cocederos de mejillón, con una facturación de 48 millones de euros y que generan unos 500 puestos de trabajo. Y, finalmente, las empresas conserveras, que en lo que respecta al mejillón, registran una facturación de 66 millones de euros y dan empleo a unas 900 personas. En conjunto, la facturación del sector mejillonero en Galicia alcanza los 340 millones de euros anuales y genera aproximadamente 10.500 puestos de trabajo directos, lo que significa el 30% del total de las actividades en las zonas costeras circundantes a los polígonos de bateas, así como cerca del 18 % del total del empleo en los municipios referidos (Franco, 2006).

Recientemente, el mejillón de Galicia, ha obtenido la **«Denominación de Origen Protegida (DOP) Mejillón de Galicia»** que concede la Unión Europea, por primera vez, a un producto del mar (Reglamento nº 510/2006, publicado en el Diario Oficial de la Unión Europea de 28 de diciembre de 2006). La mencionada denominación es un distintivo de calidad, que diferencia al mejillón originario de Galicia del de cualquier otra procedencia, a través de una certificación de calidad a nivel europeo, y debe suponer un impulso en el desarrollo del sector.

1.4.3. BREVE DESCRIPCIÓN ANATÓMICA, HISTOLÓGICA Y FISIOLÓGICA DEL MEJILLÓN

1.4.3.1. LA CONCHA

Los mejillones son moluscos bivalvos que tienen el cuerpo comprimido lateralmente y encerrado en una concha rígida, calcárea, formada por dos valvas similares. Las valvas son de color negruzco, alargadas y relativamente lisas, aunque se observan anillos de crecimiento concéntricos. La parte anterior es puntiaguda mientras que la posterior es redondeada. El margen dorsal de cada valva es convexo mientras que el ventral es ligeramente cóncavo (figura 1.10).

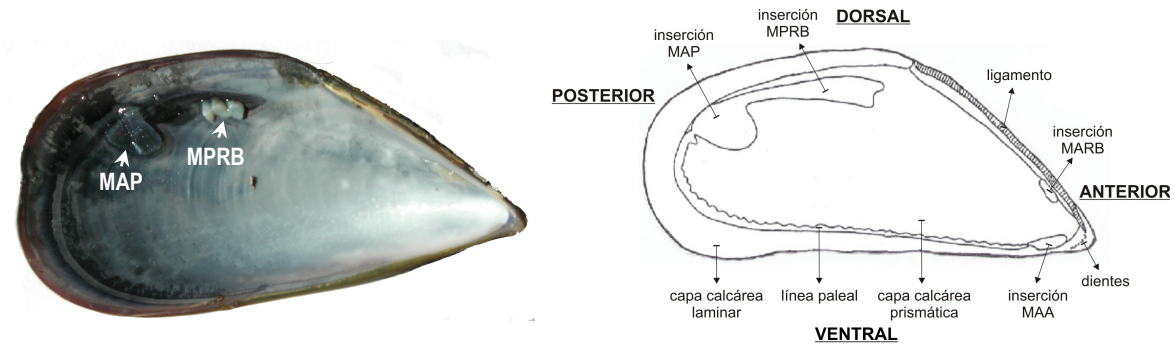


Figura 1.10. Morfología de la concha de *M. galloprovincialis*

Ambas valvas se mantienen unidas mediante una bisagra situada en la parte antero dorsal, formada por una banda estrecha y elástica, de naturaleza proteica, denominada **ligamento**, y se articulan por medio de la charnela, una estructura de 3-4 pequeños dientecillos, en la región bisagra de cada valva, que encajan con los de la valva contraria.

Las valvas están recubiertas en su parte externa por un material de naturaleza proteica, denominado **periostraco**; esta capa exterior puede observarse, a veces, plegada sobre el eje ventral de la valva, en especimenes frescos. Debajo del periostraco orgánico se sitúa una **capa calcárea** formada por **prismas** de carbonato cálcico, y debajo de ésta, una **capa calcárea** nacarada, formada por **láminas** de carbonato cálcico; esta capa laminar es secretada por las células epiteliales del manto y se halla en contacto con el cuerpo del molusco.

1.4.3.2. EL MANTO

Anatómicamente, el manto es un estructura formada por **dos lóbulos** que se encuentran unidos en la cara anterior y en la cara dorsal, formando una especie de capuchón que engloba la boca y los palpos labiales. En cambio, en la cara postero-ventral, ambos lóbulos se hallan abiertos

permitiendo la salida al exterior del biso y del pie (figura 1.11.A). Entre los lóbulos aparece un espacio interno, la cavidad paleal, en la que se alojan los diferentes órganos del molusco. El tejido está adherido y fijado a la concha a través de fibras musculares o **músculo paleal**. La línea de anclaje de este músculo a la concha discurre paralela y próxima al borde de las valvas y se denomina línea paleal (figura 1.10).

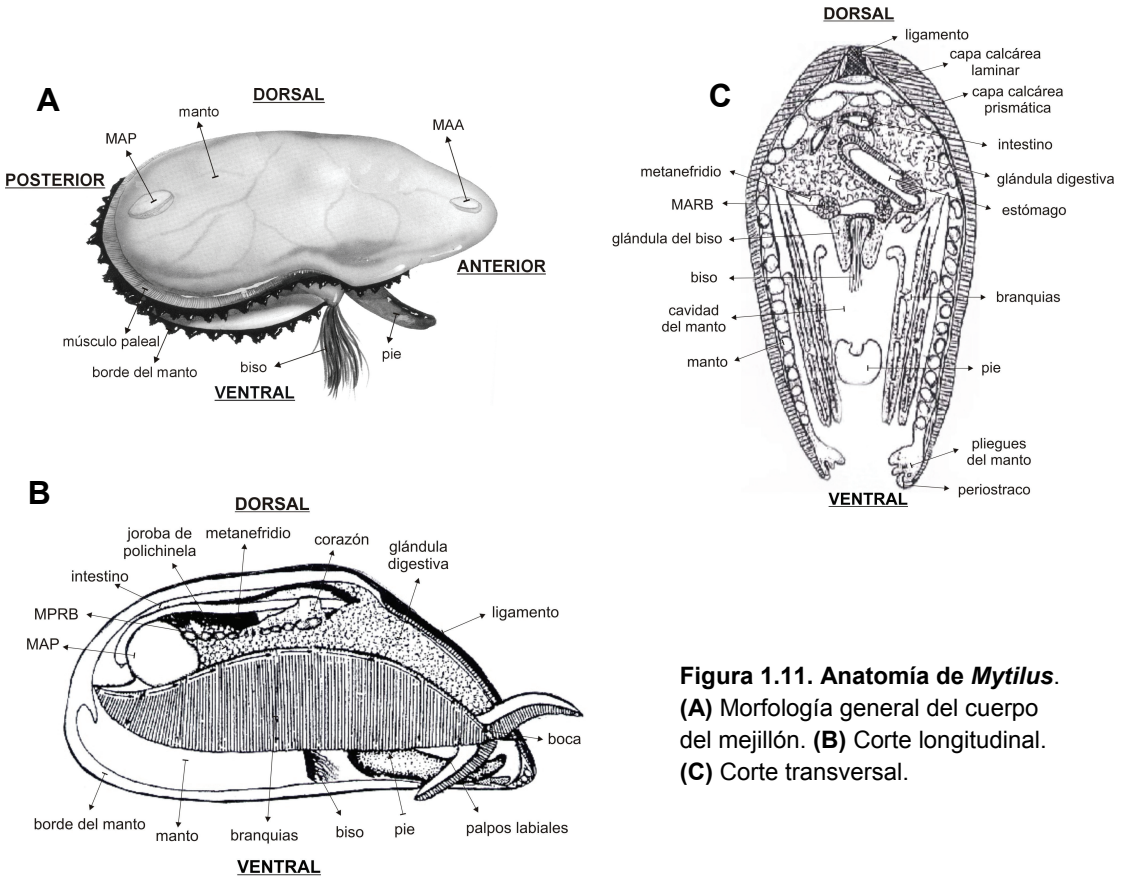


Figura 1.11. Anatomía de *Mytilus*. **(A)** Morfología general del cuerpo del mejillón. **(B)** Corte longitudinal. **(C)** Corte transversal.

El manto tiene una estructura laminar, de espesor variable en función de la etapa de desarrollo gametogénico. Por una parte puede considerarse como un **tejido de reserva energética**, que acumula tanto glucógeno como triglicéridos. Por otra parte, dada su proximidad anatómica con la glándula genital, el manto es utilizado para el **desarrollo de la estructura gonadal**. El estudio histológico del tejido, realizado en diferentes estadios de desarrollo gametogénico de *Mytilus galloprovincialis* (Crespo, 1989) muestra que la estructura gonadal, que se origina tanto en machos como en hembras en la glándula genital, se expande e invade el manto, utilizando las reservas energéticas acumuladas en el mismo. En consecuencia, este tejido sufre grandes cambios estacionales tanto en su estructura histológica como en su composición bioquímica. (Gabbot, 1983; Villalba, 1995; Ibarguren *et al*., 1990).

Los **constituyentes básicos del manto** son: (*a*) epitelio que rodea el tejido, donde abundan las células secretoras y mucosas (*b)* tejido de reserva, constituido por las células adipogranulares (ADG) y las células vesiculares (V); (*c*) gónada: gametos, células germinales, gonoductos y células auxiliares, y (*d*) sistema de circulación hemolinfática. Todos estos tipos celulares mantienen su unidad como tejido gracias a los elementos de sostén del tejido conjuntivo, cuya matriz extracelular está formada por la sustancia fundamental –glucosaminoglucanos unidos a proteínas– escasa y amorfa, y por fibras de colágeno, más abundantes cerca del epitelio (Crespo, 1989; Crespo y Espinosa, 1990).

Las células vesiculares almacenan mayoritariamente glucógeno en su interior. Se encuentran repartidas por todo el tejido, generalmente localizadas en grupos, y rodeadas por las células adipogranulares y por tejido conjuntivo. Durante los períodos de máxima acumulación de reservas presentan una gran vesícula central de glucógeno, y raramente, una o dos inclusiones lipídicas. El núcleo es ovoide y se localiza en una estrecha banda de la periferia del citoplasma (Pipe, 1987; Crespo, 1989).

Las células adipogranulares se disponen entre las células vesiculares de mayor tamaño. Su núcleo es redondo y se sitúa en la periferia celular. Presentan un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado, numerosos ribosomas libres y pequeñas vesículas asociadas al aparato de Golgi, lo que indica una alta actividad biosintética. Su rasgo más distintivo es la abundancia de gránulos proteicos y de grandes inclusiones lipídicas esféricas, y variables en tamaño y en número (Pipe, 1987; Peek y Gabbott, 1989; Peek *et al*., 1989).

El borde de los lóbulos del manto posee, sobre todo en la cara postero–ventral, unas prolongaciones de color violeta oscuro que se entrelazan, constituyendo una especie de filtro para impedir la entrada de partículas excesivamente grandes. Esta parte del manto, denominada **zona marginal o borde del manto**, presenta **tres pliegues** denominados **externo, medio e interno** (figura 1.12) (Morton, 1992).

El pliegue interno, de carácter muscular, es el de mayor tamaño y posee numerosas papilas sensoriales con aspecto de prolongaciones irregulares, que recorren todo el borde del manto, especialmente en la región postero-ventral. Debajo del epitelio que recubre el pliegue interno, se encuentran numerosas células basófilas, probablemente secretoras de *mucus*. El pliegue medio, mucho más pequeño, tiene una función sensorial, transmitiendo numeroso estímulos externos al sistema nervioso central. El pliegue externo, por su parte, tiene una función secretora. La superficie interna de este pliegue se encarga de la secreción del periostraco, la matriz orgánica formada por proteínas modificadas, que constituye la parte más externa de la concha. El periostraco recién sintetizado permanece adherido al fondo del surco entre los pliegues externo y medio,

denominado surco periostracal, y se prolonga hacia el exterior por encima del pliegue externo y alrededor del borde de la valva. Por otra parte, la superficie externa del pliegue externo es responsable de la secreción de la capa calcárea prismática de la concha.

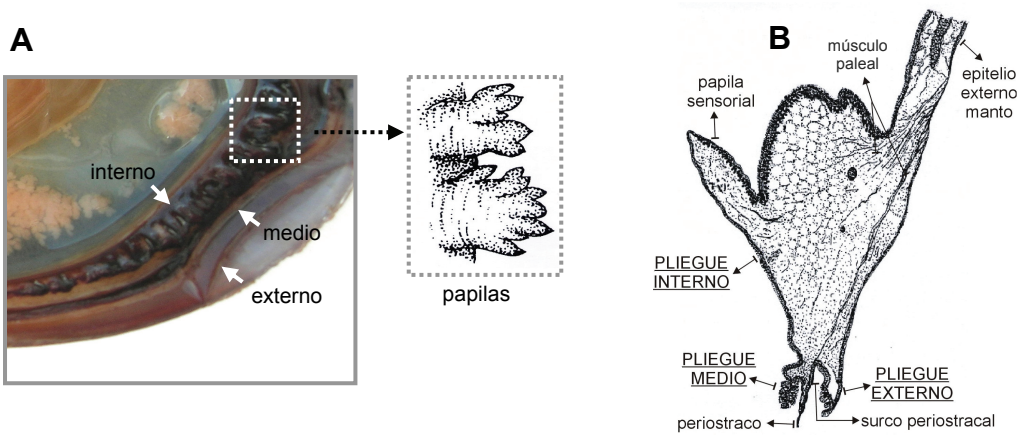


Figura 1.12. Estructura anatómca del borde del manto. (**A**) Fotografía del borde del manto mostrando los pliegues externo medio e interno. (**B**) Corte transversal del borde del manto.

En esta zona del borde del manto también se observan el músculo paleal, a través del cual el manto se adhiere a la concha. Este músculo se divide en dos componentes: unas fibras musculares se extienden hacia el surco periostracal y sirven para retraer el borde del manto cuando el molusco cierra las valvas. Otras fibras se dirigen hacia el pliegue interno permitiendo el movimiento del mismo.

1.4.3.3. LA GÓNADA

Los mejillones son moluscos bivalvos de sexos separados (**especie gonocórica**), (Skibinski *et al*., 1994; Zouros *et al*., 1994; Stewart *et al*., 1995), con una baja incidencia de hermafroditismo (Seed y Suchanek, 1992; Beaumont y Abdul-Martin, 1994). No existe dimorfismo sexual; externamente los dos sexos son iguales, por lo que es necesario realizar examen macroscópico o microscópico del tejido del manto ó para poner de manifiesto el sexo del individuo (Mikhailov *et al*., 1996). La edad a la que alcanza la primera madurez sexual es de 5 a 8 meses después de haberse producido la fijación de las larvas al sustrato, presentando tallas de 15 a 35 mm.

El sistema reproductor en *Mytilus edulis* fue descrito en detalle por White (1937). Las gónadas están alrededor de las asas intestinales, y aunque son pares, se hallan tan próximas que aparentan una sola, conociéndose más como «joroba o glándula de polichinela» que forma parte de la masa visceral. En estos moluscos, la gónada no es un órgano diferenciado sino que **se desarrolla**

invadiendo el tejido del manto durante el ciclo reproductor. Por tanto su volumen y aspecto externo varía a lo largo de la gametogénesis.

En *Mytilus edulis*, la gónada está formada por numerosos conductos que se ramifican a través del manto, terminado cada uno en un folículo genital, dentro del cual las células germinales evolucionan en el transcurso de la ovogénesis o de la espermatogénesis. Los conductos principales o gonoductos forman en el manto tres troncos principales, que confluyen en la región dorsal del cuerpo a nivel del pericardio. Dichos gonoductos, a su vez, terminan en una papila genital que se abre al exterior en las proximidades del músculo aductor posterior. Los gonoductos están revestidos interiormente de un epitelio monoestratificado, y carecen de estructuras musculares, realizándose la expulsión de los gametos mediante movimientos ciliares (Lubet, 1959).

Crespo (1989) propuso un modelo microanatómico de la gónada de *Mytilus galloprovincialis* según el cual la estructura gonadal se encuentra organizada en **gonoductos principales** de gran diámetro, con función ductal propiamente dicha, y en **asas germinales** interconectadas entre sí, las cuales presentan tanto función germinal como ductal.

1.4.3.4. LOS MÚSCULOS ADUCTORES

Las valvas de la concha se pueden mantener firmemente cerradas por acción de dos músculos, cuyos extremos se hallan adheridos a cada una de las valvas. Uno de ellos, de mayor tamaño, se sitúa en la parte posterior y se denomina **músculo aductor posterior** (MAP), mientras que el otro, mucho más pequeño, se localiza en el extremo anterior del molusco, y es conocido como **músculo aductor anterior** (MAA) (figura 1.10).

Los músculos aductores, junto con los músculos retractores del biso y del pie –que se describen más adelante– son ejemplos de **músculos «catch»** o contracción lenta, especializados en mantener la tensión con un pequeño gasto de energía. Esta tensión pasiva puede ser mantenida durante largos períodos de tiempo, después de que la excitación del músculo haya cesado. Estructuralmente los músculos «catch» son similares a los músculos lisos de mamíferos, ya que no se observa una disposición ordenada de los filamentos, pero poseen fibras musculares con un diámetro notablemente mayor (5 μm *vs* 2 μm). Los filamentos gruesos son más largos (>30 μm) y de mayor diámetro (>40 nm) en comparación con los presentes en músculos de vertebrados. La mayor anchura es debida a la presencia de paramiosina –una proteína ausente o presente en muy pequeñas concentraciones en músculos de vertebrados– que constituye el corazón de los filamentos gruesos y sobre cuya superficie se distribuye la miosina y otras proteínas (Twarog, 1967).

1.4.3.5. LAS BRANQUIAS

Las branquias o «ctenidia» son unas estructuras laminares de color marrón, situadas entre el manto y la masa visceral (Morton, 1992; Le Pennec *et al.*, 2003a).

Cada una de las dos branquias está formada por dos láminas: una **externa** –más próxima al manto– y otra **interna**. A su vez, cada lámina branquial está formada por **dos lamelas**: la **lamela descendente**, interior, que se dirige hacia la parte ventral, y que continúa con la **lamela ascendente**, exterior, que se dirige de nuevo hacia la parte dorsal (figura 1.13A). De esta manera, cada una de las branquias, en un corte transversal, muestra una forma de «W». Las líneas interiores de la «W» corresponden a las lamelas descendentes, que se hallan unidas a la masa visceral a través del denominado eje branquial, donde se sitúan los vasos aferente y eferente, y también los principales músculos responsables del movimiento branquial. Las dos líneas exteriores de la «W» se corresponden con las lamelas ascendentes, cuyos extremos superiores se hallan libres, es decir, no unidas a la masa visceral. Hacia la parte dorsal, ambas lamelas descendente y ascendente se hallan separadas entre sí por una estrecha cavidad interlamelar mientras que hacia la parte ventral –parte inferior de la «W»– forman un septo interlamelar ya que ambas se hallan unidas a través de numerosos puentes interfilamentosos.

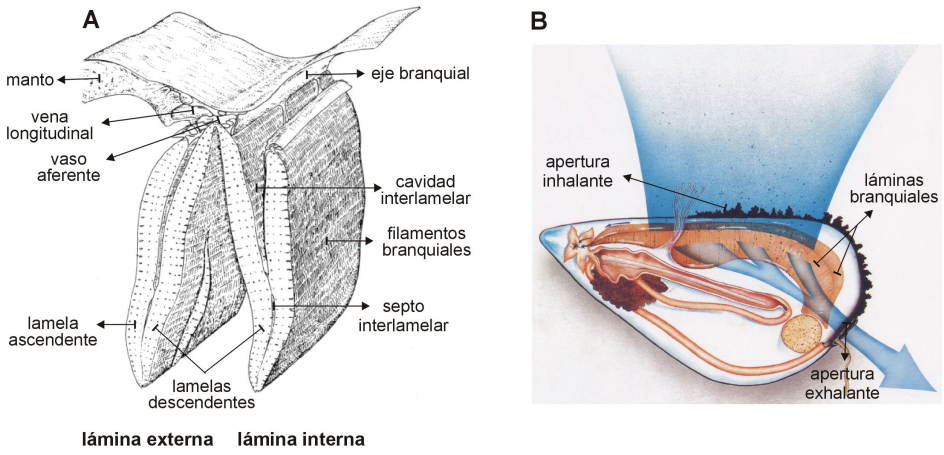


Figura 1.13. (**A**) Estructura de las láminas branquiales en corte transversal. (**B**) Esquema de entrada y salida del agua de mar portando partículas alimenticias a través del cuerpo del mejillón.

Cada una de las lamelas está formada por series de filamentos, dispuestos de forma paralela, y unidos unos a otros a través de uniones interfilamentosas compuestas por tejido conjuntivo y fibras musculares. Estos **filamentos constituyen las unidades funcionales básicas de las branquias**. En los Filibranquios –como el mejillón– los filamentos son largos y estrechos. La cara

interna de los filamentos, que delimita el espacio interlamela, se denomina **cara dorsal o abfrontal** y carece de cilios. La cara opuesta, denominada **cara ventral o frontal**, posee cilios frontales, frontolaterales y laterales.

Cada una de las unidades que forman un filamento está constituida por un corazón –formado por tejido conjuntivo fibroso, fibras musculares y una estructura quitinosa de sostén– rodeado de células ciliadas –frontales, frontolaterales y laterales– en la cara frontal, y de células no ciliadas en la cara abfrontal. Además de las células ciliadas se encuentran también otros tipos celulares como células mucosas –intercaladas entre las células ciliadas– y hemocitos circulantes.

Las branquias **desempeñan una doble función respiratoria y alimenticia** (Morton, 1983). Por una parte son responsables de la hematosis –intercambio de sustancias gaseosas entre la hemolinfa y el medio acuoso– y por otra parte están implicadas en la captación de partículas alimenticias del medio y en la absorción de nutrientes y sustancias orgánicas disueltas. Estas funciones son realizadas por las células ciliadas y mucosas que atraen, seleccionan, capturan y conducen las partículas alimenticias del fitoplancton hacia los palpos labiales y la boca (Jorgensen, 1989; Iglesias *et al*., 1993). Gracias al movimiento del complejo ciliar, el agua del medio, rica en oxígeno y alimento, penetra por la abertura inhalante, situada en posición ventral, pasa a través de las laminillas branquiales donde es captado el oxígeno y el alimento, y sale al exterior por la abertura o sifón exhalante, situado en la posición antero-dorsal (figura 1.13B).

Tanto la actividad respiratoria y la alimenticia, como al coordinación de los movimientos ciliares están regulados por el sistema nervioso, a través del nervio branquial que se forma en el ganglio visceral (Good *et al*., 1990; Paparo, 1992).

1.4.3.6. LOS PALPOS LABIALES

Los palpos labiales son unas estructuras delgadas y alargadas, con forma triangular, que rodean la boca (figura 1.14). Su función es **seleccionar y conducir la entrada de alimento**, captado por las branquias, al aparato digestivo (Morton, 1992; Le Pennec *et al*., 2003b). Las partículas recogidas por las branquias y no aptas para ser ingeridas son envueltas en *mucus* y expulsadas al exterior constituyendo las pseudoheces.

Cada uno de los dos palpos labiales está formado por dos lamelas: externa e interna, asociadas respectivamente con las láminas externa e interna que constituyen cada branquia. Por tanto, hay una lamela de cada palpo labial asociada con una lámina branquial. Cada lamela está conectada físicamente con su homóloga de la cara opuesta formando una especie de labios que rodean la boca.

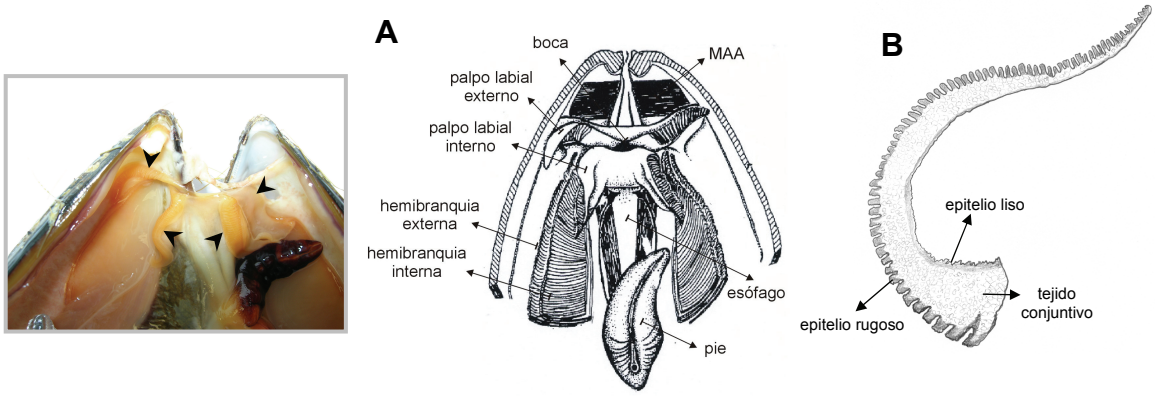


Figura 1.14. Localización **(A)** y estructura **(B)** de los palpos labiales

Histológicamente, cada lamela está constituida por una **cara de epitelio liso** y una cara ondulada, llamada **epitelio rugoso**, que forma crestas y valles, situados de forma perpendicular al eje de la lamela.

El epitelio liso está formado por células con forma cúbica, con pequeños cilios y con grandes núcleos ovoides situados a nivel basal o apical. Este epitelio se apoya en una membrana basal relativamente gruesa y contiene células eosinófilas y mucosas.

El epitelio rugoso está formado por células alargadas, cilíndricas, con núcleos pequeños y redondos. Existen notables diferencias entre cada una de las partes del epitelio rugoso que se encuentran a cada lado de las crestas. Desde la base de cada cresta, el epitelio que tapiza el lado derecho es mucho más grueso que el del lado izquierdo. Además, el epitelio del lado derecho presenta ondulaciones, mientras que el otro es liso. Las células son uniformes y tienen cilios pequeños que se distribuyen por todo el epitelio. La membrana basal sobre la que se apoya el epitelio rugoso es más fina que la del liso y está formada por fibras de tejido conjuntivo y fibras musculares. Las células mucosas presentan un citoplasma claro, carecen de cilios y son más abundantes en los valles que en las crestas. También se observan células eosinófilas (Le Pennec *et al*., 2003b).

Entre los dos epitelios se encuentra el tejido conjuntivo, donde el elemento predominante son las células vesiculares vacuoladas, caracterizadas por su gran tamaño y núcleos pequeños y periféricos (Lenoir *et al*., 1989). También existen fibras musculares transversales y longitudinales. Este tejido sirve de soporte a ambos epitelios.

1.4.3.7. EL APARATO DIGESTIVO

El aparato digestivo consta de una **boca, esófago, estómago e intestino**. Rodeando el estómago y parte del intestino se localiza la **glándula digestiva o hepatopáncreas** (figura 1.15) (Morton, 1983; 1992; Purchon, 1987a; Boucaud-Camou y Henry, 2003)

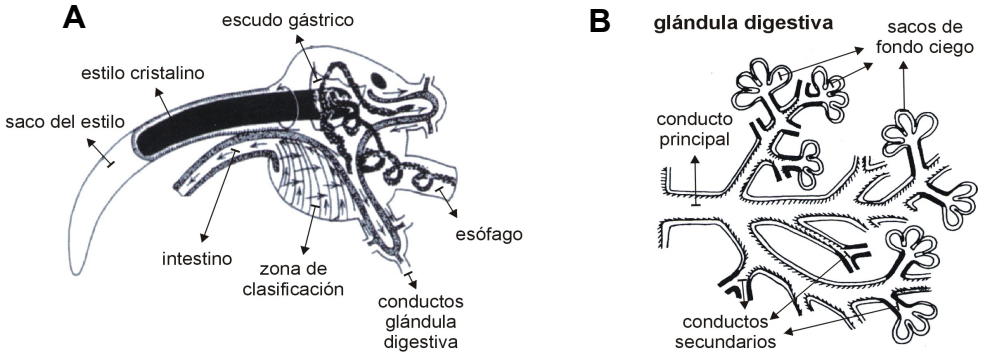


Figura 1.15. Estructura del aparato digestivo **(A)** y detalle de la glándula digestiva **(B)**

La boca, localizada entre los palpos labiales, da lugar a un pequeño y estrecho esófago que se abre a la cara anterior del estómago, donde también desembocan los conductos de la glándula digestiva.

El epitelio del estómago es ciliado, irregular, con numerosas ondulaciones tapizadas por células de diferentes tamaños. Las células epiteliales son de tipo columnar, con un núcleo central pequeño y esférico. Presenta células mucosas y eosinófilas repartidas por el epitelio. La membrana basal es gruesa, con abundantes elementos celulares y fibrillas.

En la pared anterior del estómago, se encuentra una pequeña placa de quitina, denominada **escudo gástrico**, y una protuberancia llamada **saco del estilo**, que se sitúa al lado del intestino. El saco del estilo secreta una sustancia gelatinosa que llega a consolidarse formando un bastoncillo muy compacto denominado **estilo cristalino**. El estilo cristalino rota en el interior del saco por acción de los cilios de la pared, y la parte que sobresale hacia el estómago se va desgastando y disolviendo por rozamiento contra el escudo gástrico, liberando al lumen del estómago enzimas digestivas, fundamentalmente carbohidrasas –amilasas y glucanasas– y también lipasas. Otras enzimas similares son también secretadas por las paredes del estómago, de tal forma que la digestión de los hidratos de carbono y lípidos ocurre, parcialmente, en la cavidad estomacal. Por el contrario, las proteínas son digeridas en la glándula digestiva, ya que el estilo cristalino carece de proteasas.

El contenido estomacal, con partículas parcialmente digeridas, es dirigido hacia la **región separadora**, un complejo ciliado formado por crestas y valles situado sobre la pared del estómago. En esta región, las partículas pequeñas y pesadas, o las partículas en exceso, son enviadas directamente hacia el intestino para ser eliminadas, mientas que las partículas pequeñas y ligeras son conducidas, a través de los ductos que desembocan en el estómago, hacia la glándula digestiva, donde continuará el proceso de digestión.

La **glándula digestiva**, también conocida como hepatopáncreas, es una gran masa compacta, de color marrón oscuro, que rodea el estómago y una parte del intestino. Se compone de numerosos divertículos digestivos de fondo ciego, globulares o alargados, con un espacio interior o lumen, que desembocan en un ducto secundario, no ciliado. Los ductos secundarios, a su vez, confluyen en los ductos primarios, ciliados, que desembocan en el estómago. Los divertículos digestivos están formados fundamentalmente por dos tipos de células: digestivas o acidófilas y secretoras o basófilas. Las primeras poseen un núcleo cerca de la cara basal y un citoplasma lleno de vacuolas digestivas. **En los divertículos de la glándula digestiva continúa el proceso de degradación de las partículas parcialmente digeridas que llegan del estómago** a través de los ductos. Este proceso de digestión puede ser extracelular, por las enzimas presentes en el lumen, pero fundamentalmente es una digestión intracelular, en el interior de las vacuolas de las células digestivas, donde existen glucanasas, proteasas e hidrolasas lisosomales. Una vez completada la digestión intracelular, los nutrientes son transportados desde las células digestivas a la hemolinfa o al tejido conjuntivo periglandular, mientras que los residuos de la digestión se acumulan formando unas partículas esféricas denominadas cuerpos residuales. En la fase final del proceso, las células digestivas se rompen para liberar lisosomas y cuerpos residuales acumulados en su parte apical, los cuales, a través de los ductos llegan al estómago y posteriormente al intestino para ser eliminados.

El **intestino** es muy largo y forma dos asas. Tiene un epitelio ciliado y abundantes glándulas mucosas. Su función fundamental es el transporte de las heces, que son expulsadas en forma de pequeñas bolitas y arrastradas por la corriente exhalante. La porción del intestino entre el estómago y el recto recibe el nombre de intestino medio. Lo más característico en él es la presencia de un profundo surco en su pared interna, denominado surco intestinal. El epitelio que lo reviste está constituido por células bastante regulares, alargadas y estrechas, con núcleos ovoidales en posición basal y cromatina condensada en gruesos gránulos. Es un epitelio ciliado, con numerosas células mucosas y eosinófilas y en el que también se observan fagocitos. La membrana basal es rica en fibrillas.

1.4.3.8. EL PIE Y EL BISO

El pie es un apéndice pigmentado localizado aproximadamente en el medio de la masa visceral, en la parte ventral (figura 1.16). A diferencia de otros moluscos bivalvos, en los que el pie es utilizado para excavar, en el mejillón, esta estructura es utilizada para otras funciones, como la de **inspeccionar el entorno**, y sobre todo, la de **fabricar** una estructura formada por hebras que permite al molusco adherirse de forma permanente a un sustrato, y que se conoce con el nombre de **biso**.

El pie tiene una hendidura que lo recorre longitudinalmente por su cara posterior, denominada surco del biso. En la base del pie se sitúa una glándula, conocida como **glándula del biso**, y a lo largo del surco se localizan, al menos, otros cuatro tipos de glándulas, denominadas **glándula de colágeno, glándula fenólica, glándula mucosa y glándula accesoria o enzimática** (figura 1.16B) (Vitellaro-Zucarello, 1980; 1981; 1983; Waite, 1992). Todas ellas sintetizan, almacenan y secretan las diferentes proteínas precursoras, que se mezclan en el surco y originan las hebras del biso. El biso del mejillón es el mejor estudiado entre los bivalvos y consta de cuatro partes: raíz, pedúnculo, hebra y placa de adhesión (revisiones: Brown, 1952, Waite, 1992). La raíz es la única que contiene células y se halla embebida en la base muscular de la base del pie. El pedúnculo es una estructura con apariencia telescópica, enraizada en los músculos retractores; en ella se inserta cada hebra mediante una especie de pulsera. Las hebras son extensiones fibrosas de longitud variable que terminan en una placa a través de la cual tiene lugar la adhesión al sustrato. El corazón de cada hebra está formado fundamentalmente por **tres proteínas con una estructura similar al colágeno**, denominadas **Col-P, Col-D, y Col-NG**. Las dos primeras se distribuyen en cada hebra formando un gradiente de concentración, de tal manera que Col-P predomina en la región proximal –situada cerca del pie– más elástica, mientras que Col-D es más abundante en la región distal, más rígida. Estas características mecánicas de las dos partes de la hebra son debidas a la presencia de dominios similares a los de la elastina y a los de la fibroína de la seda en Col-P y Col-D respectivamente (Qin y Waite, 1995; 1998; Waite *et al*., 1998). Las hebras están recubiertas por una cutícula externa protectora, con un grosor de 4–5 μm, formada fundamentalmente por una proteína denominada Mefp-1 («*M*ytilus *e*dulis *f*oot *p*rotein») (Sun y Waite, 2005). Finalmente, en la **placa adhesiva distal**, que actúa como pegamento para adherir la hebra del biso al sustrato, se han identificado **cinco diferentes proteínas Mefp** (Mefp 1 – Mefp 5) que se caracterizan por la presencia de un aminoácido poco frecuente en las proteínas: el 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina o L-DOPA (revisión: Waite, 2002).

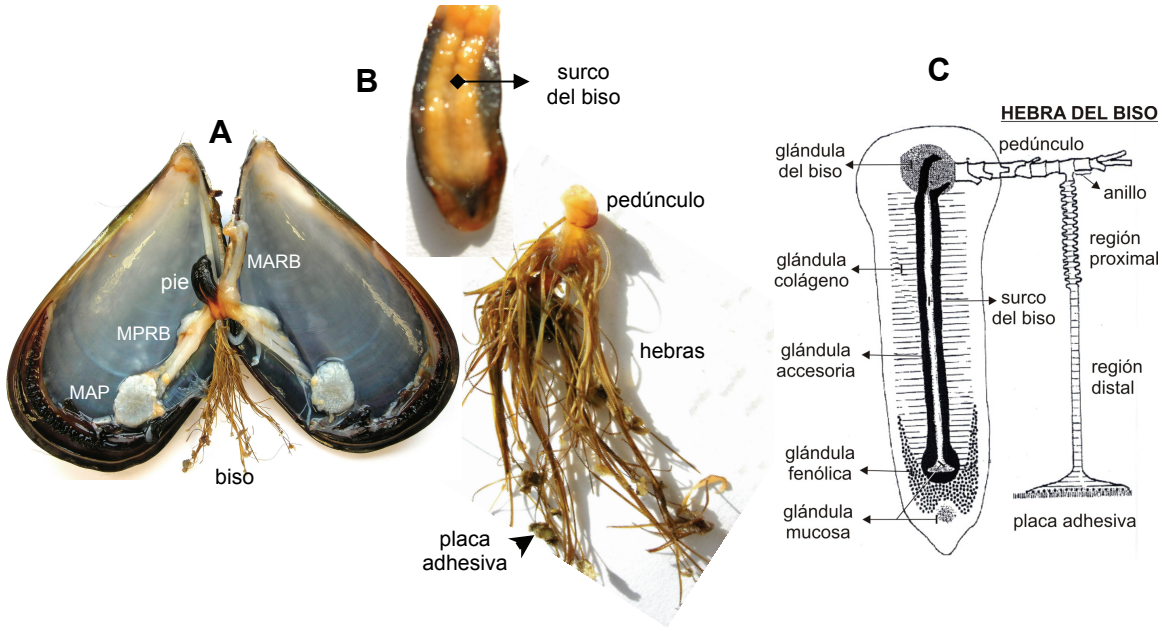


Figura 1.16. Localización (**A**) y estructura (**B**) del pie y del biso. (**C**) Localización de las glándulas secretoras del biso

Además de ser la estructura que aloja las glándulas secretoras de las proteínas del biso, el pie es una **estructura muscular**, donde se encuentran diferentes tipos de músculos que le permiten alargarse, o rotar más de 180º, o abrir y cerrar los bordes del surco del biso.

El pie y el biso se mueven con respecto al cuerpo por acción de una serie de músculos extrínsecos, con forma de cuerda y en número par, que se unen por uno de sus extremos a la concha y por el otro se insertan en la base del pie o a nivel de la glándula del biso. Se denominan **músculos retractores del biso, anteriores y posteriores** (MARB, MPRB), y músculo posterior retractor del pie, y son responsables de la retracción del pie y de que el molusco pueda modular la tensión del biso y ajustar su proximidad a un sustrato.

1.4.3.9. EL SISTEMA CIRCULATORIO

El aparato circulatorio, cuya función es la de distribuir por todo el cuerpo el oxigeno y el alimento, y recoger el anhídrido carbónico y los productos de desecho, está formado por el corazón, el sistema arterial y el sistema venoso (Hill y Welsh, 1966; Narain, 1976).

El **sistema vascular es abierto**, y por tanto, la hemolinfa y las células sanguíneas o hemocitos dejan eventualmente los vasos para invadir las lagunas o senos tisulares. La hemolinfa es impulsada por el corazón situado en el interior de la cavidad pericárdica, que se localiza dorsalmente (figura 1.11B). El corazón está formado por un único ventrículo y dos aurículas laterales. El ventrículo muscular se pliega rodeando al intestino –de forma que la cavidad

pericárdica envuelve no sólo al corazón, sino también a un tramo del tubo digestivo– y está conectado con la fina pared de las dos aurículas que le aportan la sangre oxigenada desde las branquias. En las aurículas existen unas estructuras denominadas glándulas pericárdicas, que forman parte del sistema excretor. Las glándulas pericárdicas están formadas por unas células, los podocitos, implicadas en el proceso de ultrafiltración de sustancias de desecho desde la sangre hacia la cavidad pericárdica, que es drenada por los riñones o metanefridios (Andrews y Jennings, 1993).

Las células sanguíneas o **hemocitos son células multifuncionales** implicadas en: (*i*) regeneración de tejidos blandos y de la concha (Rudell, 1971; Cheng, 1984); (*ii*) digestión y transporte de nutrientes y procesos de excreción (Feng *et al*., 1977; Narain, 1973); (*iii*) función defensiva, gracias a su capacidad para fagocitar partículas externas y patógenos (Moore and Lowe, 1977; Cheng, 1981; Bayne, 1990; Cao *et al*., 2004); (*iv*) reconocimiento y degradación de agentes externos mediante la secreción extra o intracelular de lectinas y enzimas, o la producción de radicales libres (Moore y Gelder, 1985; Nappi y Ottaviani, 2000; Novas *et al*., 2004). En base a sus características morfológicas y a la separación mediante técnicas de citometría de flujo se han diferenciado en *Mytilus galloprovincialis* dos grandes tipos de hemocitos, denominados hialinocitos o células RH, y hemocitos granulares o células SH (Barcia, 1999).

1.4.3.10. EL SISTEMA EXCRETOR

Está formado por **dos riñones o metanefridios que drenan la cavidad pericárdica**, que es la que recibe el ultrafiltrado de la sangre originado por las aurículas. Cada metanefridio es un túbulo alargado –se extiende desde los palpos labiales hasta el músculo aductor posterior– muy contorneado, con divertículos ramificados formados por una capa simple de células columnares denominadas nefrocitos. En su extremo anterior, los metanefridios están conectados a la cavidad pericárdica por medio del canal renopericárdico ciliado, y en su parte posterior desembocan en la cavidad paleal a través del nefridioporo (Pirie y George, 1979).

El proceso de excreción en el mejillón tiene lugar por tanto a través del complejo corazón – riñón. El ultrafiltrado con sustancias de desecho, generado a nivel de las aurículas, pasa de la cavidad pericárdica a los metanefridios donde tiene lugar la reabsorción de glucosa y agua, y a continuación es expulsado a la cavidad paleal (Andrews, 1988; Andrews y Jennings, 1993).

1.4.3.11. EL SISTEMA NERVIOSO - SENSORIAL

El sistema nervioso, que presenta una simetría bilateral, está compuesto por **tres pares de ganglios** (cerebrales, pedales y viscerales) y dos largos cordones nerviosos denominados conectivos cerebroviscerales y cerebropedales (Makman y Stefano, 1984; Stefano *et al*., 1990). Los dos **ganglios cerebrales** se sitúan al lado del esófago conectados por medio de la comisura cerebral. De ellos salen los nervios que inervan el MAA, la porción anterior del manto, los palpos labiales, el esófago y estatocitos. Es además el encargado de coordinar el movimiento (Tauc, 1966).

Un par de cordones nerviosos superiores se dirigen hacia la parte posterior, pasando entre las vísceras, para dar origen a un par de **ganglios viscerales** muy próximos entre si. Estos ganglios inervan el manto, los sifones, el MAP, el músculo posterior retractor del pie, las branquias, los riñones, el corazón, la gónada y el intestino.

El segundo par de cordones nerviosos superiores se extienden centralmente y hacia atrás por el interior del pie y conecta con un par de **ganglios pedales**, que inervan la parte posterior del pie y el músculo retractor del biso.

Aunque la mayor parte de las células nerviosas presentes en el género *Mytilus* son de carácter unipolar, Vitellaro-Zucarello y De Biasi (1988) han descrito la presencia de un gran número de neuronas unipolares, algunas neuronas bipolares y unas cuantas neuronas multipolares de gran tamaño en el ganglio pedal de *Mytilus galloprovincialis*.

1.4.4. EL MEJILLÓN COMO MODELO EN INVESTIGACIÓN BIOQUÍMICA

Es indudable que aquellos trabajos de investigación que contribuyan a un conocimiento más profundo de la biología del mejillón, pueden ser útiles, a largo plazo, para **introducir mejoras en los procesos de reproducción y cultivo del molusco**, o en el procedimiento de conservación durante el período transcurrido entre su recolección y su consumo. Este hecho, dada la importancia económica de la miticultura, sería suficiente para justificar la utilización del mejillón como modelo experimental en investigación bioquímica. Por otra parte, también es conocido el uso habitual de este molusco como bioindicador de contaminación de las aguas donde reside por metales pesados u otras sustancias tóxicas.

Sin embargo, desde el punto de vista estrictamente científico, en la biología de *Mytilus* ocurren algunos **procesos particulares de adaptación al medio** que justifican por sí mismos la utilidad del molusco como modelo experimental en investigación bioquímica. A continuación describimos algunos de ellos.

1.4.4.1. EL MEJILLÓN COMO MODELO DE ADAPTACIÓN A HIPOXIA

La hipoxia, por definición, representa un estado de reducida disponibilidad de oxígeno debido a una caída en la presión parcial de oxígeno (pO_2) ambiental por debajo de los valores normóxicos. Cuando esta caída es muy fuerte se produce una situación de hipoxia severa o incluso de anoxia, y los organismos se encuentran obligados a obtener energía anaeróbicamente, por lo que a esta situación se le denomina anaerobiosis ambiental (De Zwaan y Putzer, 1985; De Zwaan y Mathieu, 1992; Grieshaber *et al*., 1994).

El mejillón se ve sometido a una **anaerobiosis ambiental** en diferentes situaciones; la más habitual se produce cuando baja la marea y el molusco cierra fuertemente las valvas para evitar la desecación de los tejidos (Gäde, 1983; Grieshaber *et al*., 1994).

Al pasar a una situación de carencia de oxígeno, y con el fin de mantener el estado energético celular, aquellos organismos (o tejidos de un organismo) que no están adaptados a situaciones de hipoxia recurren a la estimulación de la glucolisis anaeróbica para producir suficiente ATP. Esta estrategia, denominada «efecto Pasteur» conlleva el rápido consumo de las reservas de carbohidratos, y la acumulación de productos finales acídicos, y por lo tanto tóxicos (Ramaiah, 1974; Weyel y Wegener, 1996; Depré *et al*., 1998). Por el contrario, algunos organismos adaptados a situaciones de hipoxia/anoxia transitorias, como el mejillón, ralentizan su metabolismo en ausencia de oxígeno; se trata de un mecanismo de ahorro energético conocido como depresión metabólica (Storey, 1985a; Schmidt y Kamp, 1996). Este proceso de adaptación se complementa con el uso de otras estrategias, como la diversificación de las reservas energéticas utilizadas y/o el empleo de rutas fermentativas alternativas a la síntesis de ácido láctico, que son más eficientes energéticamente (De Zwaan, 1983; De Zwaan y Putzer, 1985; De Zwaan y Mathieu, 1992).

Gracias a estas estrategias –y probablemente a otras todavía no conocidas– el mejillón es **capaz de sobrevivir en condiciones de hipoxia severa o de anoxia durante periodos muy prolongados** (Grieshaber *et al*., 1994). Se han descrito valores de LT_{50} (tiempo letal para el 50% de los animales) tan altos como 35 días para *Mytilus edulis* a 10ºC (Theede *et al*., 1969) y 15 días para *Mytilus galloprovincialis* a 20ºC (De Zwaan *et al*., 1991), lo que los convierte en unos animales de experimentación muy interesante para estudiar los mecanismos bioquímicos implicados en la alta tolerancia a la hipoxia/anoxia. Es necesario recordar que la hipoxia tisular es un problema clínico serio y bastante común en mamíferos (Weyel y Wegener, 1996); de hecho, es la causa más frecuente de muerte en humanos, quienes no se pueden recuperar completamente si se les priva de oxígeno durante más de 5 a 8 minutos.

1.4.4.2. ALGUNOS MÚSCULOS DEL MEJILLÓN COMO MODELOS DE CONTRACCIÓN «CATCH»

Algunos músculos de los moluscos bivalvos tienen la capacidad específica de mantener la tensión de forma pasiva, durante largos períodos de tiempo, una vez que ha cesado el estímulo que inicia el proceso de contracción. Este estado de contracción, denominado **«mecanismo catch»** o simplemente «catch», se caracteriza por un **bajo consumo de ATP** (Twarog, 1967) y tiene lugar cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular es baja (Ishii *et al*., 1989).

Los músculos aductores, que mantienen herméticamente cerradas las valvas de la concha durante los períodos de exposición al aire del molusco, y los músculos retractores del pie y del biso, responsables de retraer el pie y de ajustar la tensión de las hebras del biso, son ejemplos de músculos «catch».

La contracción rápida (activa) de estos músculos se inicia a través de una estimulación colinérgica que provoca un aumento del nivel de Ca^{2+} en el sarcoplasma de las fibras musculares. Con el transcurso del tiempo, el nivel de calcio desciende hasta alcanzar niveles próximos a los basales, pero la tensión muscular se mantiene, con un consumo de ATP muy pequeño (estado «catch»). La relajación del estado «catch» se inicia con la liberación de serotonina (Cole y Twarog, 1972), la cual induce la fosforilación –mediada por PKA– de una proteína de alto peso molecular, denominada twitchin (Siegman *et al*., 1998; Funabara *et al*., 2003), que forma parte de los filamentos gruesos de músculos «catch» (Vibert *et al*., 1993), y constituye el principal regulador de este mecanismo de contracción. Para la contracción activa del músculo es necesario que la proteína twitchin se halle defosforilada (Siegman *et al*., 1997); este proceso es llevado a cabo, probablemente, por acción de la proteína fosfatasa 2B o calcineurina (Castellani y Cohen, 1992; Yamada *et al*., 2004).

Durante muchos años hubo debate acerca del mecanismo molecular a través del cual se mantiene la contracción en el estado «catch». Una hipótesis propone que la tensión se mantiene mediante puentes cruzados actina–miosina como consecuencia de una muy baja velocidad de ruptura de los mismos, y en consecuencia una baja hidrólisis de ATP (Lowy y Millman, 1963). Una segunda hipótesis sostiene que la tensión es mantenida gracias a estructuras de unión entre filamentos delgados y gruesos en las que no participa la miosina, es decir diferentes a las interacciones actina–miosina (Ruegg, 1971). Los datos experimentales obtenidos recientemente apoyan esta segunda hipótesis, y sugieren que la tensión muscular en el estado «catch», es mantenida a través de la interacción directa de la proteína twitchin (defosforilada) de los filamentos gruesos con las moléculas de actina de los filamentos delgados (Shelud´ko *et al*., 2004; 2007; Andruchova *et al*., 2005; Andruchov *et al*., 2006; Butler *et al*., 2006).

La mayor parte de los numerosos estudios realizados y los que se están llevando a cabo actualmente para esclarecer el mecanismo molecular del estado de contracción «catch» han utilizado o **utilizan como modelo el músculo anterior retractor del biso** (MARB) del mejillón del género *Mytilus*.

1.4.4.3. EL MEJILLÓN COMO MODELO BIOTECNOLÓGICO PARA EL DISEÑO DE PEGAMENTOS BIOLÓGICOS

Cualquiera que haya observado los mejillones en su ambiente natural se habrá sorprendido de su capacidad para adherirse con fuerza a las rocas, soportando el embate de las olas. Este anclaje permanente de los mejillones ocurre a través de las hebras del biso, cuyo extremo distal termina en una placa adhesiva constituida por sustancias que actúan como auténticos pegamentos biológicos (ver descripción del pie y biso en apartado 1.4.3.8)

A diferencia de los adhesivos sintéticos, que son ineficaces bajo el agua y requieren a menudo que las superficies de contacto estén secas y limpias, los **adhesivos biológicos de las hebras del biso**: (*i*) son eficaces bajo el agua, (*ii*) funcionan en un amplio rango de temperaturas, (*iii*) son capaces de formar enlaces de forma muy rápida (en pocos segundos) y muy estables, y (*iv*) pueden adherir una amplia variedad de sustratos, tanto orgánicos como inorgánicos, y actuar sobre superficies regulares o irregulares. Estas características, unidas al hecho de que se trata de materiales biocompatibles y no tóxicos, hacen que estos adhesivos procedentes de las hebras del biso sean especialmente interesantes desde el punto de vista biotecnológico, constituyendo un campo muy activo de investigación desde hace varias décadas hasta la actualidad (revisión: Deming, 1999). Numerosos grupos han investigado el uso de este material en aplicaciones como adhesivos quirúrgicos de tejidos, cementos dentales o para el cultivo de células (Benedict *et al.*, 1989; Green, 1995).

En los últimos años se han hecho notables progresos –fundamentalmente por el grupo del Dr. Waite, de la Universidad de California– en la identificación de las proteínas que constituyen las placas adhesivas de las hebras del biso, así como de las proteínas precursoras sintetizadas por las glándulas secretoras localizadas en el pie del molusco. Hasta la fecha se han identificado cinco **proteínas adhesivas**, denominadas Mefp («*M*ytilus *e*dulis *f*oot *p*rotein»). Las secuencias de todas ellas, deducidas en la mayoría de los casos de los correspondientes cDNAs, contienen L-DOPA (3,4-dihidroxi-l-fenilalanina), aunque su contenido varía desde un 3% en Mefp-2 hasta un 30% en Mefp-5 (revisión: Waite, 2002).

Algunas de estas proteínas, purificadas a partir de las estructuras del biso, han sido comercializadas como adhesivos naturales. Sin embargo, la obtención industrial de estas proteínas mediante purificación a partir de las hebras del biso es un proceso económicamente inviable ya que son necesarios aproximadamente 10.000 mejillones para obtener 1 g de adhesivo. Por ello, en los últimos años, algunos laboratorios han obtenido estos **adhesivos biológicos mediante la expresión de proteínas Mefp recombinantes** –bien completas o bien una parte de su secuencia– y se está investigando su potencial aplicación tanto en el campo de la electrónica como en el de la biomedicina: cirugía, reparación de implantes, implantes de córnea, ortopedia, etc. (Silverman y Roberto, 2006a, 2006b).

Otro trabajo de impacto en este campo, realizado recientemente, ha puesto de manifiesto el papel clave del **aminoácido L-DOPA** en las propiedades adhesivas de las proteínas Mefp. Utilizando técnicas especiales de microscopía, Lee *et al*. (2006) demostraron que las moléculas de L-DOPA, de forma individual, son capaces de unirse con gran fuerza a una superficie inorgánica de titanio, mediante uniones no covalentes y por tanto reversibles. Por otra parte, las moléculas de L-DOPA oxidadas –hecho que puede ocurrir en las condiciones ambientales en las que el biso es secretado– se unen débilmente al titanio, pero en cambio, pueden formar enlaces covalentes con superficies orgánicas. Por tanto, la oxidación de las moléculas de L-DOPA podría explicar la solidificación del material, secretado por las glándulas del pie, para formar las hebras del biso, tal como se sospechaba desde hacía tiempo. Estos estudios muestran que el L-DOPA, por sí mismo, podría ser un adhesivo adecuado para «pegar» biomoléculas a superficies tanto orgánicas como inorgánicas, y por tanto, de un valor incalculable para aplicaciones biomédicas (Mitchinson, 2006).

2 justificación y objetivos

El trabajo experimental de esta Tesis Doctoral se enmarca en una línea de investigación desarrollada en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de Lugo, centrada en la **caracterización de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA)** en moluscos bivalvos, y concretamente en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*.

Hay varias **razones que justifican este estudio**. En primer lugar, porque desde el punto de vista de la bioquímica comparada, la determinación de las propiedades estructurales y funcionales de la PKA del molusco, y su comparación con las correspondientes a las isoformas existentes en mamíferos, debe contribuir a entender los cambios generados en la enzima en el transcurso de la evolución; en segundo lugar, porque se ha demostrado la implicación de esta proteína quinasa en la regulación de ciertos procesos fisiológicos que ocurren, de forma, específica en moluscos bivalvos. Citamos a continuación algunos ejemplos:

1. La fosfofructoquinasa –principal enzima reguladora de la glucolisis– de manto de mejillón, al contrario de lo que ocurre con la enzima de mamíferos, se activa como consecuencia de su fosforilación por PKA (Fernández *et al*., 1994). La fosforilación ocurre en un residuo de serina localizado en la secuencia KDS^{P}IWIQTGR y provoca un aumento entre 3–4 veces la actividad de la enzima determinada en condiciones próximas a las fisiológicas (Fernández *et al*., 1997). Además, la fosforilación ocurre también *in vivo*, cuando se incuba el tejido de manto con 8-Br-AMPc, un análogo del AMPc capaz de atravesar la membrana celular (Fernández *et al*., 1998). Por otra parte, el estado de fosforilación de la fosfofructoquinasa de manto de mejillón varía estacionalmente de forma paralela a su actividad enzimática, correspondiendo el máximo nivel de fosforilación y la máxima actividad al período de otoño (Fernández *et al*., 1998). Estos datos experimentales, unidos a otros obtenidos por otros autores (Gabbot, 1983; San Juan Serrano *et al*., 1995), sugieren que, en manto de mejillón, la activación de la glucogenolisis y de la glucolisis se coordinan a través de la fosforilación –mediada por PKA– de las principales enzimas reguladoras de estas rutas: glucógeno fosforilasa y fosfofructoquinasa, respectivamente. La coordinación de ambos procesos metabólicos es necesaria para la transformación efectiva del glucógeno acumulado en el manto en lípidos de reserva para los gametos.

2. Se ha sugerido por algunos autores que la fosforilación por PKA de algunas enzimas, como fosfofructoquinasa o piruvato quinasa, podría contribuir a la regulación de la depresión metabólica que tiene lugar en algunos organismos anaerobios facultativos, como el mejillón, durante los períodos de hipoxia ambiental. La depresión metabólica forma parte de una estrategia de adaptación al medio, utilizada por estos organismos para sobrevivir durante largos períodos de tiempo en ausencia de oxígeno (Michaelidis y Storey, 1990b; 1991).

3. Algunos músculos de los moluscos bivalvos como el músculo aductor tienen la capacidad específica de mantener la tensión de forma pasiva, durante largos períodos de tiempo, con un bajo consumo energético. Se denominan músculos «catch» –ver apartado 1.4.4.2. Recientemente se ha demostrado que la fosforilación por PKA de una proteína de alto peso molecular, denominada twitchin, asociada con los filamentos gruesos de estos músculos, constituye el elemento esencial en la regulación del estado de contracción «catch» (Siegman *et al*., 1998; Funabara *et al*., 2003; Shelud´ko *et al*., 2004; Béjar y Villamarín, 2006; Butler *et al*., 2006).

En el desarrollo de esta línea de investigación centrada en el caracterización de la PKA **habíamos obtenido**, hasta el inicio del presente trabajo, **los siguientes resultados**:

- Purificación de dos diferentes isoformas de subunidad reguladora de la PKA de mejillón, a las que hemos denominado R_{myt1} y R_{myt2}. Curiosamente ambas poseen idéntico peso molecular aparente, pero muestran diferente antigenicidad (Cao *et al*., 1995a; Rodríguez *et al*., 1998).

- Determinación de algunas propiedades físico-químicas, estructurales y funcionales de R_{myt1} y R_{myt2}, que sugieren que se trata de isoformas homólogas de las subunidades reguladoras tipo I y tipo II de mamíferos, respectivamente (Cao *et al*., 1996; Díaz-Enrich *et al*., 2003).

- Determinación parcial de la secuencia aminoacídica de R_{myt1}, mediante la secuenciación de péptidos obtenidos de la digestión tríptica de la proteína. Los datos estructurales demuestran que R_{myt1} es una subunidad reguladora tipo I (Díaz-Enrich *et al*., 2003).

- Obtención de sendos anticuerpos policlonales anti-R_{myt1} y anti-R_{myt2}, utilizando como antígeno las proteínas completas purificadas. Los anticuerpos obtenidos son específicos para cada isoforma y no muestran reactividad cruzada. Además hemos obtenido un segundo anticuerpo anti-R_{myt1} utilizando como antígeno un péptido de esta proteína (Cao *et al*., 1995a; Díaz-Enrich *et al*., 2003).

- Desarrollo de un método para la purificación de la PKA_{myt2} (holoenzima) mediante cromatografía de inmunoafinidad (Cao *et al*., 1998).

- Purificación y caracterización de la subunidad C de la PKA de mejillón. Fosforilación de proteínas de un músculo «catch» por la subunidad C de la PKA (Cao *et al*., 1995b; Béjar y Villamarín, 2006).

En este trabajo de Tesis Doctoral, enmarcado en la línea de investigación descrita, nos hemos propuesto **profundizar en la caracterización estructural y funcional de las dos isoformas de proteína quinasa dependiente de AMPc identificadas en mejillón**, a través del desarrollo de los siguientes objetivos:

O1. Demostrar, mediante la obtención de datos estructurales, que la isoforma **R_{myt2} es una subunidad R tipo II**.

O2. Investigar la **capacidad de R_{myt1} y R_{myt2} para ser fosforiladas por caseína quinasa 2** y analizar, en su caso, los efectos sobre su actividad biológica.

O3. Purificar las holoenzimas que contienen R_{myt1} y R_{myt2} como subunidad R –PKA_{myt1} y PKA_{myt2}– y estudiar su activación por nucleótidos cíclicos, y la influencia de la temperatura en este proceso.

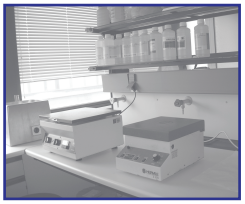
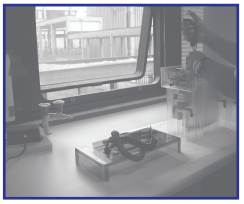
O4. Analizar la **distribución de PKA_{myt1} y PKA_{myt2} en diferentes tejidos** de mejillón

O5. Investigar la **existencia de isoformas de subunidad C** de la PKA en mejillón, asociadas con la subunidades R_{myt1} y R_{myt2}

O6. Durante el proceso de purificación de la subunidad C de la PKA a partir de músculo aductor posterior de mejillón (desarrollo del objetivo 5) hemos obtenido una **proteína que co-purifica con la subunidad C**. Por este motivo nos hemos planteado también como objetivo la identificación de esta proteína.

3 material y métodos



3.1. Material

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Los mejillones utilizados, de la especie *Mytilus galloprovincialis* Lmk., fueron recogidos en una estación depuradora localizada en Lorbé (Ría de Betanzos, A Coruña). Una vez en el laboratorio se diseccionaron los tejidos y se congelaron inmediatamente a –20 ºC hasta su utilización en un período máximo de 3 meses.

Las proteínas de mejillón (R_{myt1}, R_{myt2}, PKA_{myt1}, PKA_{myt2}, C) se purificaron a partir de tejido de MAP y de manto. En los estudios de distribución tisular de R_{myt1} y R_{myt2} se utilizaron los siguientes tejidos: manto, gónada, MAP, MARB, branquias, hepatopáncreas, palpos labiales, pie y hemocitos. Los hemocitos fueron obtenidos a partir de hemolinfa extraída del MAP utilizando el método de Barcia *et al*., 1999.

Para obtener ovocitos se depositó un mejillón hembra en un vaso de precipitados con agua de mar y aireación. El vaso se introdujo en un baño termostatizado para aumentar la temperatura de 15 a 25 ºC e inducir el desove. Una vez producido el desove, los ovocitos se recogieron filtrando el agua a través de un tamiz con un diámetro de malla de 45 µm.

3.1.2. PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOQUÍMICOS

3.1.2.1. Reactivos inorgánicos

Los reactivos inorgánicos –de grado analítico– fueron adquiridos en su mayoría a Merck Farma y Química, y VWR Prolabo.

3.1.2.2. Productos bioquímicos

AMPc	Sigma Aldrich Química
GMPc	Sigma Aldrich Química
ATP	Sigma Aldrich Química
GTP	Sigma Aldrich Química
[γ–^{32}P]ATP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic
[γ–^{32}P]GTP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic
EDTA	Sigma Aldrich Química
EGTA	Sigma Aldrich Química
DTT	Sigma Aldrich Química

Pepstatina A	Sigma Aldrich Química
Benzamidina	Sigma Aldrich Química
Iodoacetamida	Sigma Aldrich Química
Apigenina	Sigma Aldrich Química
Emodina	Sigma Aldrich Química
LY294002	Calbiochem
Triton X-100	Sigma Aldrich Química

3.1.2.3. Péptidos y proteínas

«Kemptide», sustrato de PKA	Sigma Aldrich Química SA
PKI_{5-24}, inhibidor PKA	Sigma Aldrich Química SA
Leupeptina	Sigma Aldrich Química SA
β-caseína	Sigma Aldrich Química SA
Seroalbúmina bovina	Sigma Aldrich Química SA
Caseína quinasa 2, subunidades α y β	CK2 humana recombinante, donada por el Dr. Emili Itarte, Universitat Autònoma de Barcelona (Roher *et al*, 2001)

3.1.2.4. Anticuerpos primarios y secundarios

Anti- R_{myt1}	Obtención propia (Díaz-Enrich *et al*., 2003)
Anti-R_{myt2}	Obtención propia (Cao *et al*., 1995a)
Anti-subunidad Cα PKA humana (sc903)	Santa Cruz Biotechnology
Anti-fosfoserina, monoclonal (P3430)	Sigma Aldrich Química
Anti-filamina, policlonal (ab11074)	Abcam plc.
Anti CK2α humana, monoclonal (218703)	Calbiochem
Anti-IgG ratón conjugado peroxidasa	Sigma Aldrich Química
Anti-IgG conejo conjugado peroxidasa	Sigma Aldrich Química
Anti-IgG cabra conjugado peroxidasa	Sigma Aldrich Química
Anti-IgG de ratón biotinilado (IH)	Jackson InmunoResearch Laboratories, Inc.
Anti IgG de conejo biotinilado (IH)	Jackson InmunoResearch Laboratories, Inc

3.1.2.5. Productos y columnas de cromatografía

DEAE-celulosa (DE-52) microgranular	Wathman Int. Ltd.
AMPc–agarosa [8–(2–aminoetil)tioadenosina–3´,5´monofosfato – agarosa]	BioLog Life Science Institute

GMPc–agarosa [8–(2–aminoetil)tioaguanosina–3´,5´monofosfato – agarosa]	BioLog Life Science Institute
Columna Mono- Q HR 5/5 – FPLC	GE Healthcare Bio-sciences
Columna Mono-Q HR 16/10 – FPLC	GE Healthcare Bio-sciences
Columna Mono-S HR 5/5 – FPLC	GE Healthcare Bio-sciences
Columna Superdex HR 10/30 – FPLC	GE Healthcare Bio-sciences
Columna Prot G-Superose HR 10/2 – FPLC	GE Healthcare Bio-sciences
Columna HiTrap™ desalting 5 ml	GE Healthcare Bio-sciences
Columna anti-R_{myt2}–Sepharosa	Fabricación propia (Cao *et al.*, 1998)

3.1.2.6. Productos y material de electroforesis, isoelectroenfoque e inmunotransferencia

Solución de acrilamida/bis (30%)	Bio Rad
TEMED	Sigma Aldrich Química
SDS	Sigma Aldrich Química
β-mercaptoetanol	Sigma Aldrich Química
Colorante Coomassie brilliant blue R-250	Sigma Aldrich Química
Marcadores de peso molec. SDS-PAGE	Bio Rad
TRIS	Sigma Aldrich Química
Glicina	Sigma Aldrich Química
Tween-20	Sigma Aldrich Química
Membrana Immobilon™-P	Millipore
Kit de revelado ECL-Plus™	GE Healthcare Bio-sciences
Kit de revelado Immobilon™ HRP	Millipore
Kit de marcadores IEF	GE Healthcare Bio-sciences
Gel IEF (PhastGel IEF 3-9)	GE Healthcare Bio-sciences

3.1.2.7. Productos y material para inmunohistoquímica

Parafina	Vogel
Hematoxilina de Harris	Panreac
Estreptavidina conjugada con peroxidasa	Invitrogen
3, 3´–diaminobenzidina (DAB)	Sigma Aldrich Química

3.1.2.8. Productos y material para MS

Kit Ettan CAF-MALDI para secuenciación	GE Healthcare Bio-sciences
Tripsina de cerdo «modified trypsin, sequence grade»	Promega Corp.
HCCA	Bruker Daltonics
DHB	Bruker Daltonics
Microcolumna µZipTip® C18	Millipore

3.1.2.9. Otro material

Filtros de fosfocelulosa P81	Wathman International Ltd.
Membranas de ultrafiltración PM-30	Millipore
Sistema de ultrafiltración Centricon®-30	Millipore
Sistema de ultrafiltr. Amicon® Ultra 30	Millipore
Filtros Millex® GV 0,22 µm	Millipore
Filtros Millex® HV 0,45 µm	Millipore
Tubo diálisis MWCO 12–14 kDa	Medicell International Ltd.
Placas de radiografía Agfa Curix RP2	Agfa
Revelador 153 y fijador 354	Agfa
Líquido de centelleo Ecoscint H	National Diagnostics

3.2. Métodos

3.2.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE TEJIDOS

3.2.1.1. Extractos para el análisis de la distribución tisular de R_{myt1} y R_{myt2}

La homogenización se llevó a cabo en un baño de agua-hielo utilizando tampón H –fosfato potásico 25 mM, pH 7,0, EDTA 2,0 mM, DTT 1,0 mM, PMSF 1,0 mM, benzamidina 1,0 mM, pepstatina A 1,0 µg/ml, leupeptina 1,0 µg/ml– previamente enfriado a 4 ºC. Los tejidos de MAP, pie y MARB se homogenizaron en proporción de 0,1 g de tejido/ml tampón H, con un homogenizador de cuchillas Virtis Tempestad IQ². Los tejidos de hepatopáncreas, manto, gónada, y branquias se homogenizaron en proporción de 0,3 g de tejido/ml tampón H, utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem. Los hemocitos (~$50x10^6$ células) se resuspendieron en 1,0 ml de tampón H y la suspensión se mantuvo en agitación a 4 ºC durante 30 min. Este proceso fue suficiente para romper las células.

Todos los homogenados se centrifugaron a 37.000 rpm (100.000*g*), a 4 ºC, durante 1 hora, en una ultracentrifúga refrigerada Beckman L7-80, y los sobrenadantes obtenidos se filtraron a través de una gasa, constituyendo los **extractos citosólicos**.

Los precipitados obtenidos de la centrifugación se resuspendieron en tampón H con ayuda de una varilla de vidrio, y se centrifugaron de nuevo a 37.000 rpm, a 4 ºC durante 30 min. Los precipitados obtenidos en esta segunda centrifugación se resuspendieron de nuevo en un volumen de 7,0 ml de tampón B –fosfato potásico 25 mM, pH 7,0, EDTA 2,0 mM, DTT 1,0 mM, ClK150 mM, PMSF 1,0 mM, benzamidina 1,0 mM, pepstatina A 1,0 µg/ml, leupeptina 1,0 µg/ml y Tritón X-100 al 0,25% (v/v)– con una varilla de vidrio. Las suspensiones se mantuvieron con agitación orbital durante 30 min a 4 ºC, y a continuación se ultra centrifugaron a 37.000 rpm, a 4 ºC, durante 1 hora. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron a través de una gasa, constituyendo los **extractos de membrana.**

Finalmente un volumen de 1,0 ml de cada uno de los extractos obtenidos se aplicó manualmente, con ayuda de una jeringa, a una columna de gel filtración HiTrap Desalting de 5 ml, equilibrada con tampón C: fosfato potásico 25 mM, pH 7,0, DTT 1,0 mM y ClNa 0,15 M. Se desecharon los primeros 1, 5 ml (volumen vacío de la columna) y se recogieron los 2,0 ml siguientes, que contenían las proteínas presentes en los extractos, disueltas en tampón C. Estas muestras se mantuvieron congeladas, en alícuotas, a –20 ºC hasta su utilización.

3.2.1.2. Extracto para la determinación de actividad CK2

El tejido del manto se homogenizó en una proporción 1:3 con tampón de homogenización –fosfato potásico 50 mM, pH 7,0, EDTA 2,0 mM, EGTA 2,0 mM, DTT 1,0 mM, PMSF 1,0 mM, pepstatina 1,0 µg/ml y leupeptina 1,0 µg/ml– previamente enfriado en un baño de agua-hielo, utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem. El homogeneado se centrifugó a 17.000 rpm (35.000*g*), a 4 ºC, durante 30 min, en un centrifuga refrigerada Beckman J2-21, con rotor JA-20, y el sobrenadante se filtró a través de una gasa, constituyendo el **extracto de manto**.

3.2.1.3. Extractos para la fosforilación de proteínas por isoformas de subunidad C

La homogenización de MAP y tejido de manto se llevó a cabo como se describió en el apartado 3.2.1.1, en el siguiente tampón: fosfato potásico 50 mM, pH 7,0, ClNa 0,15 M, EDTA 2,0 mM, DTT 1,0 mM, PMSF 1,0 mM, benzamidina 1,0 mM, pepstatina A 1,0 µg/ml, leupeptina 1,0 µg/ml– previamente enfriado a 4 ºC.

3.2.2. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

3.2.2.1 Purificación de PKA_{myt1} y PKA_{myt2}

PKA_{myt1} y PKA_{myt2} –holoenzimas de PKA que contienen R_{myt1} y R_{myt2} como subunidad R– se purificaron a partir de tejido de MAP y de manto de mejillón respectivamente, siguiendo un protocolo similar. Todas las etapas del proceso se llevaron a cabo a temperaturas entre 0–4 ºC.

El tejido de MAP (60 g) se homogenizó en una proporción 1:5 con tampón H –fosfato potásico 25 mM, pH 7,0, EDTA 2,0 mM, EGTA 2,0 mM, DTT 1,0 mM, PMSF 1,0 mM, pepstatina A 1,0 µg/ml y leupeptina 1,0 µg/ml– utilizando un homogenizador de cuchillas Virtis Tempestad IQ². Por cada ml de homogenado se añadió 1,75 ml de tampón H y se completó la homogenización con un homogenizador Potter-Elvehjen. El tejido de manto (200 g) se homogenizó en una proporción 1:2 con tampón H, utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem.

Ambos homogenados se centrifugaron a 17.000 rpm. (35.000*g*), durante 30 min, a 4 ºC en una centrífuga refrigerada Beckman J2-21, y los sobrenadantes se filtraron a través de una gasa. Cada extracto –de MAP y de manto– se mezcló con una resina de DEAE-celulosa, previamente equilibrada con tampón fosfato potásico 25 mM, pH 7,0, en una proporción de 30 ml de gel/g proteína, y la mezcla se mantuvo con agitación lenta durante 2 h. A continuación, se dejó sedimentar el gel para desechar el sobrenadante, y se empaquetó la resina en una columna de cromatografía. Después de lavar la columna con tampón H hasta que la absorbancia a 280 nm fue próxima a cero, las proteínas retenidas se eluyeron mediante la aplicación de un gradiente lineal de ClNa –entre 0 y 0,4 M– disuelto en el tampón H, usando el sistema automatizado de cromatografía Biologic LP de Bio-Rad. En las fracciones volumétricas recogidas se determinó la actividad proteína quinasa, tanto en ausencia como en presencia de AMPc, y aquellas fracciones con actividad proteína quinasa dependiente de AMPc, se mezclaron y concentraron mediante precipitación con sulfato amónico al 80% de saturación. El precipitado obtenido se resuspendió en tampón A –fosfato potásico 25 mM, pH 7,0, DTT 1,0 mM, PMSF 1,0 mM, pepstatina 1,0 µg/ml y leupeptina 1,0 µg/ml– y, después de centrifugar a 10.000 rpm, durante 15 min, a 4 ºC, el sobrenadante se dializó exhaustivamente frente a tampón A, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm, y se aplicó a una columna Mono-Q HR 16/10 en un equipo FPLC (GE Healthcare Bio-sciences).

Dado que habíamos observado previamente que el tejido de MAP contenía también una cantidad significativa de R_{myt2} junto con la isoforma R_{myt1} (Díaz-Enrich *et al*., 2003), el sobrenadante obtenido de la precipitación con sulfato amónico, procedente del extracto de MAP, se pasó a través de una columna de inmunoafinidad que contenía un anticuerpo anti-R_{myt2} como ligando (Cao *et*

al.,1998), a un flujo de 0,2 ml/min. Este proceso permitió retirar la isoforma PKA_{myt2} antes de aplicar la muestra a la columna Mono-Q.

La columna Mono-Q se lavó con tampón A hasta que el valor de absorbancia se aproximó a la línea base, y las proteínas unidas se eluyeron mediante la aplicación de un gradiente lineal de ClNa en tampón A. Alícuotas de las fracciones recogidas se analizaron mediante inmunotransferencia, utilizando anticuerpos anti-R_{myt1} o anti-R_{myt2}. En las mismas fracciones se determinó la actividad proteína quinasa, tanto en ausencia como en presencia del AMPc. Las fracciones que contenían los mayores niveles de actividad proteína quinasa dependiente de AMPc se mezclaron y se concentraron hasta un volumen final aproximado de 2 ml, con un dispositivo Amicon Ultra de Millipore. Finalmente, las preparaciones enzimáticas se dializaron frente a tampón fosfato potásico 25 mM, pH 7,0, DTT 1,0 mM, ClNa 0,15 M y glicerol al 15% (v/v) antes de su congelación en alícuotas a –20 ºC.

3.2.2.2. Purificación de la subunidad C de la PKA

La subunidad C de la PKA se purificó a partir de tejido de manto y de MAP de mejillón siguiendo los protocolos desarrollados en nuestro laboratorio (Cao *et al*., 1995b; Béjar y Villamarín, 2006). El método, similar en ambos casos, se basa en la unión de la PKA, a través de la subunidad R, a una resina de DEAE-celulosa, y la posterior elución específica de la subunidad C mediante la adición de AMPc al tampón, que provoca la disociación de ambas subunidades de la holoenzima.

En resumen, los extractos crudos, obtenidos a partir de tejido de manto o de MAP, se mezclaron con DE-52 microgranular previamente equilibrado, en unas condiciones de fuerza iónica y pH que permitían la unión de la PKA –a través de la subunidad R_{myt2} o R_{myt1}, respectivamente– a la resina. Después de mantener la mezcla en agitación lenta durante, al menos, dos horas, se empaquetó el gel en una columna de cromatografía y se lavó exhaustivamente con tampón de homogenización hasta que la absorbancia a 280 nm fue inferior a 0,1 unidades. A continuación, la subunidad C se eluyó mediante la adición de AMPc, hasta una concentración 0,12 mM, al tampón de homogenización. El nucleótido provoca la disociación de la holoenzima PKA, permitiendo la elución específica de la subunidad C. En las fracciones volumétricas recogidas se determinó la actividad proteína quinasa, y aquéllas más activas, se mezclaron y se concentraron por ultrafiltración a través de una membrana PM-30 colocada en un equipo Amicon modelo 8050, hasta un volumen aproximado de 3 ml.

Este método sencillo permite obtener de forma rápida una preparación de subunidad C casi pura, con bandas contaminantes minoritarias (Cao *et al*., 1995b; Béjar y Villamarín, 2006).

3.2.2.3. Separación de diferentes isoformas de la subunidad C de la PKA

La separación de diferentes isoformas de subunidad C de la PKA de mejillón se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio catiónico en una columna Mono-S HR 5/5 acoplada a un equipo FPLC (GE Healthcare Bio-sciences).

Una vez lavada y equilibrada la columna siguiendo las instrucciones del fabricante, se aplicó una muestra (2,0 ml) de la preparación de subunidad C, purificada como se describió en el apartado anterior, procedente de tejido de MAP o de manto. A continuación, se lavó la columna con tampón A –fosfato potásico 45 mM, pH 6,8, DTT 1,0 mM– a un flujo de 1,0 ml/min; la mayoría de las escasas proteínas contaminantes en la preparación de subunidad C no son retenidas y, en consecuencia, son eliminadas en este proceso de lavado. Una vez que la absorbancia a 280 nm se aproximó a la línea base, se aplicó un gradiente continuo de ClNa –entre 0–0,4 M– disuelto en tampón A, y se recogieron fracciones volumétricas de 0,5 ml que fueron congeladas en alícuotas a –20 ºC, después de añadir a cada una 50 µl de glicerol.

3.2.2.4. Purificación de R_{myt1} y R_{myt2}

La purificación de las dos isoformas de subunidad R de la PKA de mejillón –R_{myt1} y R_{myt2}– se llevó a cabo a partir de tejido MAP y de manto del molusco respectivamente, utilizando los métodos desarrollados en nuestro laboratorio y publicados previamente (Cao *et al*., 1995a; Rodríguez *et al*., 1998).

En ambos casos, la etapa crucial del proceso es una cromatografía de afinidad sobre AMPc–agarosa o GMPc–agarosa, que permite la obtención de preparaciones casi puras de ambas proteínas. El proceso se complementa con una cromatografía de intercambió aniónico sobre Mono Q-FPLC –en el caso de R_{myt2}– o de gel filtración sobre Superdex HR 10/30-FPLC –en el caso de R_{myt1}– que permiten tanto la eliminación del AMPc libre utilizado para eluir las proteínas en la etapa anterior como la separación de fragmentos proteolíticos procedentes de ambas isoformas.

Las muestras de R_{myt1} y R_{myt2} purificadas se dializaron exhaustivamente frente a tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7,0, DTT 1,0 mM, ClNa 0,15 M y glicerol al 10% (v/v), a 4 ºC, durante 24 h, con sucesivos cambios de tampón, y finalmente se congelaron en alícuotas a –20 ºC.

En algunos casos, concretamente para los experimentos de inhibición de la subunidad C por R_{myt1} o R_{myt2}, es necesario eliminar completamente el AMPc unido a ambas proteínas. Este proceso se llevó a cabo mediante el método de Buechler *et al*. (1993), basado en la desnaturalización reversible de la proteína por tratamiento con urea. A la muestra de subunidad R se le añadió urea

lentamente, hasta alcanzar una concentración 8 M, y la solución se mantuvo 30 min a temperatura ambiente. A continuación, un volumen de 1,0 ml de la muestra tratada se aplicó manualmente a una columna de gel filtración HiTrap Desalting de 5 ml, equilibrada con tampón A –fosfato potásico 10 mM, pH 7,0, DTT 1,0 mM, ClNa 0,15 M y urea 8 M– para eliminar el AMPc liberado de la proteína. Finalmente, la muestra obtenida de la gel filtración (2,0 ml) se dializó exhaustivamente frente a tampón B – fosfato potásico 10 mM, pH 7,0, DTT 1,0 mM, ClNa 0,15 M y glicerol al 10% (v/v) – para eliminar la urea y renaturalizar la proteína. La muestra dializada, que contenía la subunidad R activa, se concentró por ultrafiltración en un dispositivo Centricon-30 hasta un volumen aproximado de 1,0 ml, y se congeló en alícuotas a –20 ºC.

3.2.2.5. Purificación y reconstitución de otras proteínas

La subunidad R tipo IIα se purificó a partir de corazón porcino según el método de Rannels *et al*. (1983). La subunidad C de corazón porcino se purificó siguiendo el método de Reimann y Beham (1983).

Las subunidades catalítica (α) y reguladora (β) de la CK2 humana, recombinantes y purificadas, fueron generosamente regaladas por el Dr. Emili Itarte, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Barcelona. La holoenzima CK2 fue reconstituida incubando 30 min a 30 ºC cantidades equimolares de CK2α y CK2β en tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, ClNa 0,15 M y BSA al 0,1% (p/v) (Roher *et al*., 2001).

3.2.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

En la mayoría de los casos, la concentración proteica de las muestras se determinó mediante el método de Bradford (1976) que se basa en la fijación sobre las proteínas del colorante azul de Coomassie G-250.

- *Reactivo azul de Coomassie*: se disolvieron 100 mg de azul de Coomassie G-250, en 50 ml de etanol al 95% y a continuación se añadió un volumen de 100 ml de una solución de ácido fosfórico al 85% (p/v). La mezcla se diluyó hasta un litro con agua Milli-Q y se mantuvo a temperatura ambiente durante un periodo máximo de tres meses. Antes de cada uso, el reactivo se filtró a través de papel Wathman nº 1.

- *Solución estándar de BSA*: se disolvieron 10 mg de BSA en 10 ml de agua Milli Q. La solución proteica se repartió en alícuotas que se mantuvieron congeladas a –20 ºC.

-*Proceso:* en diferentes cubetas de espectrofotómetro se depositaron muestras con cantidades crecientes de BSA –entre 0,1 y 1 µg de proteína– procedentes de la solución estándar. Al mismo tiempo, en otras cubetas, se depositó, por duplicado, un volumen determinado de las muestras problema, convenientemente diluidas. En todos los casos los volúmenes se ajustaron a 100 µl con agua Milli Q y, finalmente, a cada cubeta se le añadió un volumen de 1 ml del reactivo azul de Coomassie. Una vez agitadas las cubetas con las muestras, y después de esperar un tiempo entre 5 y 20 minutos, se midieron los valores de absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro UV/visible PU 8720 de Phillips, ajustando la absorbancia a cero con una cubeta que contenía solamente agua (o tampón) y reactivo. Con los datos de absorbancia y las correspondientes cantidades de BSA estándar se construyó una recta patrón, a partir de cuya ecuación se estimó la concentración proteica de las muestras problema.

En algunos casos, particularmente en la determinación de la estequiometría de fosforilación de R_{myt2}, la cantidad de proteína presente en el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie se determinó mediante densitometría, utilizando como estándar cantidades conocidas de BSA sometidas al mismo proceso. En ambos casos, la densidad de las bandas proteicas se determinó con un analizador de imagen VersaDoc de BioRad.

3.2.4. METODOS ELECTROFORETICOS

3.2.4.1. SDS-PAGE

Se realizó según el método de Laemmli (1970) utilizando cubetas de electroforesis Mini-Protean® 3 o Protean® II xi, de Bio Rad.

- *Construcción de los geles:* los geles de poliacrilamida se construyeron a partir de las siguientes soluciones:

Solución A: 30 % acrilamida/bis 37,5/1 (2,6% C)
Solución B: tampón Tris-ClH 1,5 M, pH 8,8
Solución C: tampón Tris-ClH 0,5 M, pH 6,8
Solución D: SDS al 10% (p/v)
Solución E: persulfato amónico al 10% (p/v)

El gel completo consta de un gel separador y un gel concentrador. Para construir el gel separador se mezclaron, en un volumen final de 15 ml, los siguientes componentes: 4,0 ml solución B, 5,0 ml de solución A (gel de poliacrilamida al 10%), 150 µl de solución D, 75 µl de solución E –preparada en el momento de usar– 10,0 µl de TEMED y agua Milli Q en cantidad suficiente para 15 ml. Con

esta solución se rellenó el espacio entre los cristales hasta aproximadamente 1,5 cm del borde superior, e inmediatamente, para evitar la formación de menisco, se añadió un volumen de aproximadamente 0,5 ml de isopropanol, que fue retirado posteriormente una vez que el gel había polimerizado.

El gel concentrador se construyó mezclando los siguientes componentes: 2,5 ml solución C, 1,3 ml de solución A (gel de poliacrilamida al 4%), 100 µl de solución D, 50 µl de solución E –preparada en el momento de usar– 10 µl de TEMED y agua Milli Q en cantidad suficiente para 10 ml. La mezcla se añadió sobre el gel separador rellenando completamente la cámara, e inmediatamente se colocó el peine formador de los pocillos, evitando la formación de burbujas y se dejo polimerizar.

- *Tratamiento de las muestras*: a cada muestra se le añadió ¼ de volumen de tampón desnaturalizante: Tris-ClH 250 mM, pH 6,8, SDS al 8% (p/v), β-mercaptoetanol al 20% (v/v), glicerol al 40% (v/v) y azul de bromofenol al 0,01% (v/v). Una vez mezcladas con el tampón, las muestras se calentaron a ebullición, durante 5–10 min, en un baño Precisterm S-138 de Selecta, se microcentrifugaron, y se aplicaron directamente en los pocillos del gel, o se mantuvieron congeladas a –20 ºC hasta su aplicación.

- *Desarrollo de la electroforesis:* se llenó la cubeta con tampón de electroforesis Tris/Glicina pH 8.3, preparado por dilución de la siguiente solución 5X: 15 g de Tris base, 72 g de glicina, 5 g de SDS y agua Milli-Q en cantidad suficiente para un litro. Antes de la aplicación de las muestras, se equilibró el gel haciendo pasar una corriente de 200 V durante 30 min a 4 ºC. Una vez aplicadas las muestras en los pocillos, se desarrolló la electroforesis a 4 ºC, ajustando el voltaje a 200 voltios, y finalizando el proceso cuando el bromofenol alcanzó el extremo final del gel.

- *Proceso de tinción*: la tinción se llevó a cabo con una solución de azul de Coomassie –0,1 g de azul de Coomassie R-250 disueltos en 40 ml de metanol, 10 ml de ácido acético y 50 ml de agua Milli Q– manteniendo el gel durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente, en la solución de teñido, con agitación suave. El proceso de desteñido se llevó a cabo sumergiendo el gel en la solución decolorante –40 ml de metanol y 10 ml de ácido acético y 50 ml de agua Milli Q– durante 1–2 horas con agitación constante y renovando varias veces la solución.

3.2.4.2. Determinación del peso molecular mediante SDS-PAGE

La muestra con la proteína problema se sometió a una SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 7,5% o al 10% dependiendo del valor de peso molecular esperado. De forma paralela se aplicó una muestra de marcadores de peso molecular de BioRad, tratada con tampón desnaturalizante. En los

geles de poliacrilamida al 7,5% se utilizaron marcadores de alto peso molecular: miosina (200 kDa), β-galactosidasa (116,2 kDa), fosforilasa b (97,4 kDa), BSA (66,2) y ovoalbúmina (45,0 kDa); en los geles al 10% se aplicaron marcadores de bajo peso molecular: fosforilasa b (97,4 kDa), BSA (66,2) y ovoalbúmina (45,0 kDa), anhidrasa carbónica (31,0 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa).

A partir de la ecuación de la recta obtenida al representar *log* peso molecular *v*s los correspondientes valores de *Rf* de los marcadores se estimó el peso molecular de la proteína problema.

3.2.4.3. Isoelectroenfoque (IEF)

EL IEF se llevó a cabo en un equipo automatizado de electroforesis PhastSystem (GE Healthcare Bio-sciences) utilizando un gel del poliacrilamida PhastGel IEF con un gradiente de pH 3–9.

La aplicación de las muestras se llevó a cabo de la siguiente forma: con ayuda de una micropipeta se depositaron 4 µl de muestra en las muescas de un aplicador de muestras PhastGel 6/4, y a continuación se colocó el aplicador en su posición, cerca del cátodo. El desarrollo del IEF se llevó a cabo de forma automática mediante la aplicación de un programa con las condiciones recomendadas por el fabricante para el gel utilizado. Una vez finalizado el proceso, se tiñó el gel con una solución de azul de Coomassie R-250, utilizando para ello la cámara de tinción del propio equipo y aplicando un programa de tinción recomendado por el fabricante.

De forma paralela a la muestra problema se aplicó una muestra de proteínas de punto isoeléctrico (*pI*) conocido: β–lactoglobulina A (5,20), anhidrasa carbónica B bovina (5,85), anhidrasa carbónica B humana (6,55), mioglobina equina ácida (6,85), mioglobina equina básica (7,35), lectina ácida (8,15), lectina media (8,45) y lectina básica (8,65). El valor de *pI* de la proteína problema se determinó por interpolación a partir de la posición de los marcadores de *pI* conocido.

3.2.5. INMUNOTRANSFERENCIA O «WESTERN BLOTTING»

Las muestras proteicas –extractos o proteínas purificadas– se sometieron a una SDS-PAGE al 10% y las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon®-P, aplicando una corriente de 400 mA, durante 2–4 h a 4 ºC, en una cubeta de transferencia Mini Trans-Blot® o Trans-Blot® de BioRad. Una vez realizado el proceso de transferencia se procedió de la siguiente manera:

- *Bloqueo*: se incubó la membrana con solución bloqueante –leche descremada al 5% (p/v) en tampón TTBS: Tris/ClH 20 mM, pH 7,5, ClNa 0,15 M y Tween 20 al 0.1%– durante 6 h a temperatura ambiente.

- *Lavados*: 6 x 10 min a temperatura ambiente con TTBS.
- *Anticuerpo primario*: se incubó la membrana toda la noche a 4 ºC con el anticuerpo primario diluido en TTBS como se indica en la tabla 3.1.
- *Lavados*: 6 x 10 min a temperatura ambiente con TTBS.
- *Anticuerpo secundario*: se incubó la membrana 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido en TTBS como se indica en la tabla 3.1.
- *Lavados*: 6x10 min a temperatura ambiente con TTBS.
- *Revelado*: las membranas se cubrieron con el reactivo ECL-Plus™ o Immobilon™ Western HRP durante 5 min, y a continuación se pusieron en contacto con una placa de radiografía Agfa Curix RP2 durante un tiempo entre 3–60 s, en función de la intensidad de la señal de luminiscencia. Finalmente, las placas de radiografía fueron reveladas manualmente en cámara oscura.

Tabla 3.1. Anticuerpos y diluciones utilizadas en inmunotransferencia

anticuerpo primario	*dilución*	*anticuerpo secundario*	*dilución*
Anti-R_{myt1}	1 : 300	anti-IgG ratón	1 : 25.000
Anti-R_{myt2}	1 : 20.000	anti-IgG conejo	1 : 50.000
Anti-PKA Cα	1 : 2.500	anti-IgG conejo	1 : 50.000
Anti-CK2α	1 : 500	anti-IgG ratón	1 : 25.000
Anti-Ser^P	1 : 2.000	anti-IgG ratón	1 : 25.000
Anti-filamina	1 : 750	anti-IgG cabra	1 : 50.000

3.2.6. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PKA

La actividad PKA se determinó utilizando el péptido sustrato específico, denominado «kemptide», como aceptor de ^{32}P. La mezcla de reacción estándar contenía, en un volumen total de 50 µl, Tris/ClH 50 mM, pH 7,0, DTT 1,0 mM, Cl_2Mg 5,0 mM, «kemptide» 100 µM, [γ-^{32}P]ATP 0,2 mM (~100 cpm/pmol) y la muestra de PKA (subunidad C) convenientemente diluida. En los casos en que se determinó la actividad de la holoenzima PKA, la mezcla de reacción estándar contenía, además, AMPc o GMPc a las concentraciones indicadas en cada caso. En aquellos casos en que se pretendía medir la inhibición de la subunidad C por R_{myt1} o R_{myt2}, la mezcla de reacción estándar contenía, además, las cantidades indicadas de subunidad R libre de AMPc, obtenida como se

describió en el apartado 3.2.2.4. En los estudios cinéticos, la actividad se determinó a diferentes concentraciones de «kemptide» y ATP, como se indica en cada caso. Las reacciones transcurrieron durante un tiempo entre 10–15 min, a 25 ºC o a la temperatura especificada en cada caso.

En los experimentos para determinar la influencia de la temperatura sobre la actividad PKA, las mezclas de reacción, con todos los componentes excepto el ATP, se pre-incubaron a las temperaturas indicadas, en un baño de temperatura programado Techne RB-5A. A los 15 min, se añadió ATP para iniciar las reacciones, que transcurrieron a la misma temperatura de pre-incubación.

En todos los casos las reacciones se pararon mediante la adición de 10 µl de ácido fosfórico 300 mM enfriado en hielo, e inmediatamente, un volumen de 30 µl de la mezcla se depositó sobre un disco de papel de fosfocelulosa P81. Los discos, colocados individualmente en los departamentos de una cestilla, se lavaron 3 veces por inmersión durante 10 min en una solución de ácido fosfórico 75 mM –para eliminar el [γ-^{32}P]ATP libre– y a continuación, se secaron bajo una lámpara y se colocaron en viales a los que se añadieron 5 ml de líquido de centelleo Ecoscint H. La radiactividad se midió en un contador de centelleo beta Beckman LS 6000 TA.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 nmol de fosfato desde el ATP al «kemptide» en 1 min.

3.2.7. FOSFORILACION POR CK2

3.2.7.1. Fosforilación de R_{myt1} y R_{myt2} por CK2

Para comprobar si alguna de las dos isoformas de la subunidad R de la PKA de mejillón se fosforilaban *in vitro* por CK2, se incubaron muestras (1,0 µg de proteína) de R_{myt1} y R_{myt2} purificadas, durante 30 min a 30 ºC, en tampón de fosforilación –Tris/ClH 50 mM, pH 7,5, EDTA 1,5 mM, EGTA 1,5 mM, Cl_2Mg 25 mM, β-glicerolfosfato 25 mM, y DTT 1,0 mM– con la subunidad catalítica de CK2 (CK2α, 2 pmol) o con la holoenzima CK2 (subunidades α y β, 2 pmoles) reconstituida como se describió en el apartado 3.2.2.5. La reacción se inició con la adición de [γ^{32}P]GTP 100 µM (~500 cpm/pmol). Como control positivo de fosforilación se utilizó una muestra de β-caseína (0,5 µg de proteína), que se incubó en las mismas condiciones. En algunos casos, las reacciones se llevaron a cabo en presencia de alguno de los siguientes inhibidores de CK2: apigenina 50 µM, emodina 50 µM o LY294002 50 µM. En todos los casos el volumen total de la mezcla de reacción se ajustó con agua a 30 µl.

Las reacciones se pararon por adición de ¼ de volumen de tampón de electroforesis desnaturalizante –Tris-ClH 250 mM, pH 6,8, SDS al 8% (p/v), β-mercaptoetanol al 20% (v/v), glicerol al 40% (v/v) y azul de bromofenol al 0,01% (v/v)– y calentamiento en un baño a ebullición durante 5–10 min. Una vez frías, las muestras se microcentrifugaron y se sometieron a una SDS-PAGE al 10%. Finalizada la electroforesis, se tiñó el gel de poliacrilamida con azul de Coomassie, se destiñó, y a continuación se secó en un secador de geles GelDryer 543 de BioRad. La detección de las bandas marcadas radiactivamente se llevó a cabo poniendo el gel seco en contacto con una placa de radiografía Agfa Curix RP2, en el interior de un casete, a –20 ºC durante un tiempo variable entre 6–48 h, y el revelado manual de la misma en cámara oscura.

En algunos casos las autoradiografías obtenidas se analizaron por densitometría en una equipo VersaDoc Imaging System, de BioRad.

3.2.7.2. Estequiometría de fosforilación de R_{myt2}

Una muestra de R_{myt2} purificada se incubó a 30 ºC en tampón de fosforilación (ver apartado anterior) con [γ^{32}P]GTP 100 µM (750 cpm/pmol), en presencia o ausencia de holoenzima CK2 (2 pmoles/µg R). A los tiempos que se indican en la figura correspondiente se retiraron alícuotas de la mezcla y se pararon las reacciones añadiendo ¼ de volumen de tampón de electroforesis desnaturalizante, y calentando en un baño a ebullición durante 5–10 min.

Las muestras tratadas, correspondientes a los diferentes tiempos de incubación, se sometieron a una SDS-PAGE al 10%. Una vez teñido el gel con azul de Coomassie y desteñido, se recortaron cuidadosamente las bandas correspondientes a R_{myt2} con ayuda de un bisturí, y los trozos de gel se introdujeron en viales de centelleo y se secaron bajo una lámpara. A continuación se añadió a cada vial un volumen de 250 µl de H_20_2 al 30% (v/v) y se incubaron en un baño a 50 ºC hasta la completa disolución de los trozos de gel. Finalmente, se añadió a cada vial un volumen de 5 ml de líquido de centelleo Ecoscint H y se midió la radiactividad en un contador de centelleo beta Beckman LS 6000 TA.

A partir de los valores de cpm obtenidos, y teniendo en cuenta la actividad específica del GTP utilizado (750 cpm/pmol), se calcularon los pmoles de ^{32}P incorporado a la proteína, a los diferentes tiempos de incubación. La cantidad de proteína presente en cada muestra se determinó como se describió en el apartado 3.2.3.

3.2.7.3. Efecto de la fosforilación por CK2 sobre la actividad de R_{myt2}

Una muestra de R_{myt2} libre de AMPc (~3 µg de proteína), obtenida como se describió en el apartado 3.2.2.4, se fosforiló mediante incubación durante 2h a 30 ºC, en presencia de tampón de fosforilación, con holoenzima CK2 (2 pmol/ µg R) y GTP 100 µM (R_{myt2} fosforilada). De forma paralela, otra muestra similar de R_{myt2} fue incubada en las mismas condiciones pero omitiendo el GTP en la mezcla de reacción (R_{myt2} no fosforilada). Transcurrido el tiempo de reacción, ambas muestras se mantuvieron congeladas en alícuotas a –20 ºC hasta su utilización.

Para comprobar el efecto inhibidor de R_{myt2} fosforilada y no fosforilada sobre la actividad proteína quinasa A, muestras de subunidad C de la PKA de mejillón (1,2 pmoles; actividad 41,6 moles P/min/mol C) se incubaron 10 minutos a 4 ºC con cantidades crecientes –entre 0 y 3,7 pmoles– de R_{myt2} fosforilada y no fosforilada, y la actividad PKA se midió utilizando el péptido «kemptide» como aceptor de fosfato, como se describió en el apartado 3.2.6.

El efecto de R_{myt2} fosforilada y no fosforilada sobre la actividad de la subunidad C también se comprobó utilizando histona tipo II A como sustrato. En este caso, una muestra de subunidad C (1,1 pmol) se incubó 10 min a temperatura ambiente con una cantidad fija (1.8 pmol) de R_{myt2} no fosforilada, o fosforilada por CK2. A continuación, se añadió a cada muestra 10 µg de histona tipo IIA y [γ-^{32}P]ATP 0.2 mM (~500 cpm/pmol), y las mezclas se incubaron otros 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se pararon las reacciones añadiendo ¼ de volumen de tampón de electroforesis desnaturalizante y calentando en un baño a ebullición durante 5–10 min. Las muestras se sometieron a una SDS-PAGE al 10%, y el gel, una vez teñido, desteñido y secado, se puso en contacto con una placa de radiografía como se describió en el apartado 3.2.7.1.

3.2.7.4. Medida de actividad CK2 en extractos de mejillón

Para detectar la posible presencia de actividad CK2 en mejillón se incubaron muestras de β-caseína y de R_{myt2}, durante 1 h a 30 ºC, en tampón de fosforilación, con [γ^{32}P]GTP 100 µM (~500 cpm/pmol) y una alícuota (10 µg de proteína) de extracto crudo obtenido a partir de tejido de manto de mejillón, como se describió en el apartado 3.2.1.2. La incubaciones se realizaron en ausencia y en presencia de los inhibidores de CK2 –apigenina, emodina, o LY294002– a una concentración de 50 µM.

Finalizando el tiempo de incubación, se pararon las reacciones mediante la adición de ¼ de volumen de tampón de electroforesis desnaturalizante y calentamiento de las muestras en un baño a ebullición durante 5–10 min. Para detectar las bandas proteicas que habían incorporado ^{32}P, las diferentes muestras tratadas se sometieron a una SDS-PAGE al 10%, y a continuación se tiñeron los

geles, se destiñeron, se secaron y se pusieron en contacto con una placa de radiografía como se describió en el apartado 3.2.7.1. Las autoradiografías obtenidas se analizaron por densitometría en una equipo VersaDoc Imaging System de BioRad.

3.2..8. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

Los diferentes tejidos de mejillón diseccionados se fijaron en líquido de Bouin durante 12 h, y a continuación se introdujeron en una solución de etanol al 70%. Para su inclusión, los tejidos se deshidrataron en soluciones de concentración creciente de etanol (70%–96%–absoluto), se incubaron en dos soluciones de xilol, y se embebieron en parafina con punto de fusión 56-57 ºC. Los bloques de parafina con las muestras se cortaron en secciones de 4-5 µm de grosor en un microtomo Leica RM2115. Las secciones se adhirieron a portaobjetos tratados con poli-L-lisina, y a continuación se desparafinaron y se hidrataron por inmersión en sucesivos baños de xilol y etanol de concentraciones decrecientes.

En el caso de los ovocitos, obtenidos como se describió en el apartado 3.1.1, se realizó un frotis que se dejó secar, y a continuación se fijó con alcohol/acetona al 50% a –20 ºC durante 10 min.

Para el análisis inmunohistoquímico las muestras se trataron según el siguiente protocolo:

- Lavado: 1x 5 min con PBS: tampón fosfato salino, pH 7,2.
- Inmersión en una solución de H_2O_2 al 3% en PBS para inhibir la actividad de las peroxidasas endógenas
- Lavados: 2x 5 min con PBS
- Incubación con anticuerpo primario, diluido en PBS con BSA al 0,05%, durante toda la noche a 4 ºC
- Lavados: 3x5 min con PBS
- Incubación con anticuerpo secundario biotinilado, diluido en PBS con BSA al 0,05% 30 min a 37 ºC
- Lavados: 3x 5min con PBS
- Revelado: se realizó mediante el sistema biotina-estreptavidina-peroxidasa. El anticuerpo secundario biotinilado se unió a estreptavidina conjugada con peroxidasa, y como sustrato de la peroxidasa se utilizó una solución de 3,3´–diaminobenzidina (DAB) 10 mg/ml en agua Milli-Q. La reacción química se paró con agua corriente, controlando el revelado con el microscopio óptico.
- Tinción de contraste con hematoxilina de Harris para visualizar los núcleos.

Tabla 3.2. Anticuerpos y diluciones utilizados en inmunohistoquímica

anticuerpo primario	*dilución*	*anticuerpo secundario*	*dilución*
Anti-R_{myt1}	1 : 90	anti-IgG ratón	1 : 800
Anti-R_{myt2}	1 : 4.000	anti-IgG conejo	1 : 500

En los controles negativos se omitió el anticuerpo primario. Las fotografías se realizaron con una cámara digital E-20p acoplada a un microscopio óptico modelo BX61, ambos de la marca Olympus.

3. 2.9. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS – MS

3.2.9.1. Descripción general del procedimiento utilizado

La identificación de proteínas se llevó acabo mediante dos procedimientos complementarios: (*a*) la obtención del espectro de masas de la mezcla de péptidos procedentes de la digestión de la proteína en cuestión (PMF, huella de masas peptídicas) y (*b*) la determinación de la secuencia aminoacídica de algunos de los péptidos obtenidos. Ambos procesos se realizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF-MS y MALDI-TOF/TOF-MS, en colaboración con el Dr. Ulf Hellman, del Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala.

Resumidamente, el proceso experimental se realizó de la siguiente forma: una vez realizada la digestión de la proteína, se obtuvo un PMF de la muestra mediante MALDI-TOF-MS. Por otra parte, algunos de los péptidos obtenidos se secuenciaron mediante MALDI-TOF/TOF-MS, utilizando el procedimiento CAF-PSD (Hellman y Bhikhabhai, 2002; Conrotto y Hellman, 2005). Básicamente, este procedimiento consiste en la sulfonación del grupo amino primario N-terminal de los péptidos resultantes de la digestión tríptica, mediante tratamiento de la muestra, previo al análisis por MS, con el reactivo CAF (éster del ácido 3-sulfopropiónico con N-hidroxisuccinimida) (figura 3.1). La adición de este grupo químico incrementa la masa del péptido en 136 Da. Previamente a la sulfonación es necesario realizar el bloqueo del grupo ε-amino de la Lys C-terminal, que en caso contrario, también sería sulfonado. Este bloqueo se realiza mediante un tratamiento de la muestra con sulfato de *o*-metilisourea, que provoca la guanidinación de la Lys, es decir, su conversión en homoarginina . Esta modificación química, que no afecta al grupo amino N-terminal, incrementa la masa del péptido en 42 Da.

La comparación de los espectros de las masas peptídicas (PMF), obtenidos antes y después del tratamiento de las muestra, permite diferenciar los péptidos con una Arg C-terminal, que habrán aumentado su masa en 136 Da, de los que poseen una Lys C-terminal –transformada en homoarginina– que habrán aumentado su masa en 178 Da (136 + 42). Algunos de estos péptidos pueden ser seleccionados de forma automática y fragmentados para deducir su secuencia.

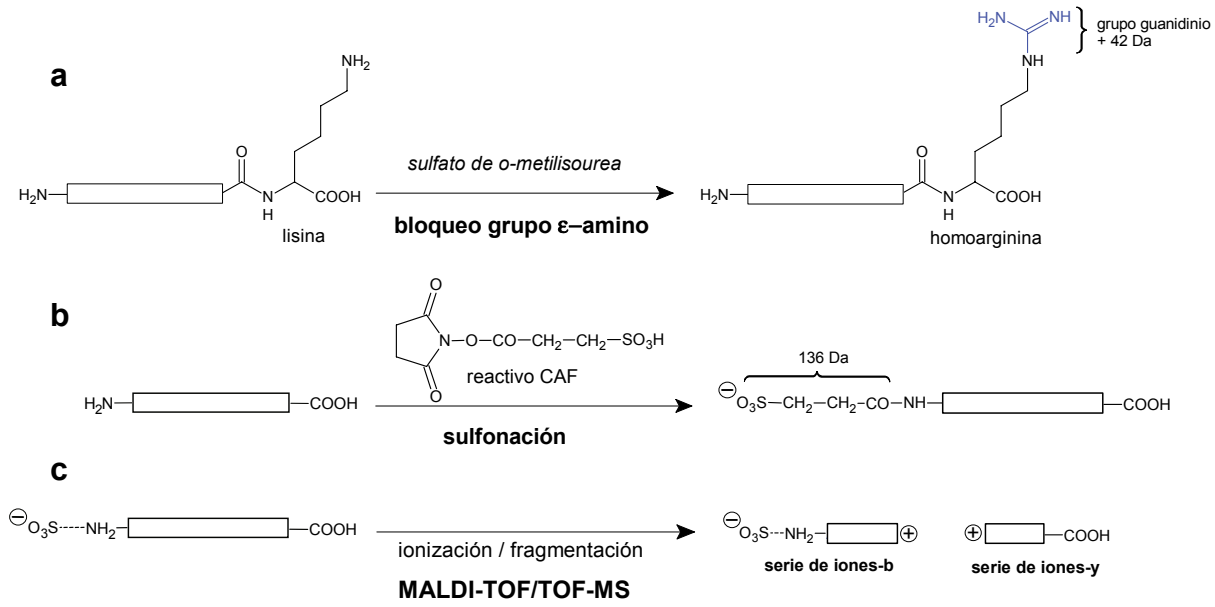


Figura 3.1. Esquema del proceso de secuenciación mediante MALDI-TOF/TOF MS – CAF-PSD. (**a**) Bloqueo del grupo ε-amino de la Lys. (**b**) Proceso de sulfonación del grupo amino teminal de los péptidos con reactivo CAF. (**c**) Representación esquemática de la distribución de carga después de la sulfonación del péptido

El procedimiento CAF supone una mejora muy notable en el proceso de secuenciación de péptidos mediante MS por dos razones: (*i*) la presencia del grupo sulfato en el extremo N-terminal favorece la fragmentación del péptido y (*ii*), en los fragmentos N-terminales, la carga negativa del sulfato contrarresta la carga positiva adquirida en la ionización de la muestra, de tal manera que los iones-b –fragmentos N-terminales– generados no llegan al detector. De esta forma, se generan espectros de fragmentación mucho más limpios y fáciles de interpretar, ya que solamente están compuestos de una serie de iones-y, correspondientes a los fragmentos C-terminales, que retienen una carga positiva (figura 3.1C).

3.2.9.2. Tratamiento y digestión de la proteína

La proteína a identificar (R_{myt2}, isoformas de subunidad C o filamina) se trató con DTT y iodoacetamida, para la reducción y alquilación, respectivamente, de restos de cisteína. Para ello, a

una muestra de proteína purificada se le añadió ¼ de volumen de tampón de electroforesis desnaturalizante suplementado con DTT 40 mM y se calentó en un baño a ebullición durante 5-10 min. Una vez enfriada la muestra, se le añadió iodoacetamida –preparada en el momento– hasta una concentración 20 mM y se incubó 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Después del tratamiento, la muestra se sometió a una SDS-PAGE al 10% y, una vez teñido el gel con azul de Coomassie y desteñido, se recortaron cuidadosamente las bandas correspondientes a la(s) proteína(s) en cuestión.

Seguidamente se llevó a cabo el proceso de digestión, mediante la incubación con tripsina –«modified tripsin sequence grade»– a 37 ºC durante toda la noche, siguiendo el protocolo de «digestión en gel» de Hellman *et a*l. (1995).

3.2.9.3. Derivatización de los péptidos

El proceso de derivatización de los péptidos resultantes de la digestión se llevó a cabo, sobre un soporte de fase sólida, en tres etapas consecutivas: la inmovilización de la muestra, el bloqueo del grupo ε-amino de la Lys C-terminal y la sulfonación del grupo N-terminal de los péptidos.

a) Inmovilización de la muestra

Se utilizó una microcolumna en punta de pipeta μZipTip C18 equilibrada con TFA al 0,1%. La muestra de péptidos a tratar, disuelta en un tampón acuoso, se adsorbió al material de fase reversa mediante 10 ciclos de aspiración/dispensación con una micropipeta a la que se había acoplado la microcolumna. Una vez adsorbida la muestra, se lavó la microcolumna con TFA al 0,1%.

b) Bloqueo del grupo ε-amino

Se realizó incubando la resina C18 con los péptidos adsorbidos con una solución de sulfato de O-metilisourea (17,2 mg/ml) en CO_3HNa 0,25 M, pH 10, durante toda la noche a temperatura ambiente.

c) Sulfonación con el reactivo CAF

Una solución de marcaje CAF –0,1 mg/μl en CO_3HNa 0,25 M, pH 9,4– preparada en el momento, se pasó lentamente, mediante aspiración/dispensación, a través de la microcolumna, y se dejó reaccionar con la muestra adsorbida durante 3 min a temperatura ambiente. Una vez retirado el reactivo con 10 μl de TFA al 0,1%, se pasó una solución de hidroxilamina al 5% en la misma solución de marcaje para hidrolizar la captación superflua de reactivo CAF por los aminoácidos con grupos hidroxilo. Después de lavar de nuevo la

microcolumna con 10 µl de TFA 0,1%, se eluyeron los péptidos sulfonados en un tubo eppendorf de 0,2 ml, mediante aspiraciones/dispensaciones sucesivas de un volumen entre 2–5 µl de una solución de TFA 0,1%/acetonitrilo 60%.

3.2.9.4. Espectrometría de masas

Todos los experimentos se realizaron utilizando un equipo MALDI-TOF/TOF Ultraflex de la casa Bruker. Las muestras se prepararon con el método «dried-droplet»: sobre un parafilm se mezcló un volumen de 0,3 µl de muestra con un volumen igual de una solución a saturación de ácido 4-hidroxi-α-cianocinámico (HCCA) –que actúa como matriz– en TFA 0,1%/acetonitrilo 40%, y se depositó una gota de 0,3 µl de la mezcla sobre la tarjeta de acero inoxidable del MALDI. En algunos casos se utilizó ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) como matriz.

Con el instrumento en «modo reflector» se analizaron todas las muestras, antes y después de la derivatización, para obtener los correspondientes espectros PMF. Por comparación de ambos espectros, se identificaron los péptidos con Arg C-terminal o con Lys C-terminal –cuyas masas habían incrementado al derivatizar en 136 Da y 178 Da respectivamente– candidatos para la secuenciación. A continuación, se cambió el instrumento a «modo PSD», se ajustó el selector de iones para las masas adecuadas, y se obtuvo el espectro de fragmentación correspondiente, formado exclusivamente por una serie de iones-y. Los espectros se interpretaron manualmente, deduciendo la secuencia aminoacídica mediante un simple cálculo de la diferencias entre las masas de fragmentos (iones-y) adyacentes, que se corresponden con las masas de cada aminoácido. Los únicos aminoácidos que no pueden ser discriminados mediante el método utilizado son Leu e Ile que poseen exactamente la misma masa molecular.

La búsqueda de similitudes de secuencia, para la identificación de la proteína, se realizó con el programa informático «BLAST» –utilizando la opción «short, nearly exact matches»– disponible en la página web del National Center of Biotechnology Information (NCBI) [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast] (Altschul *et al.*, 1997).

3.2.10. CÁLCULOS DE CONSTANTES CINÉTICAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

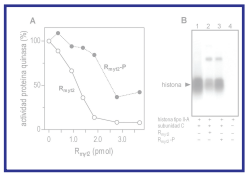
La constante de activación aparente (K_a) para AMPc y GMPc –concentración de nucleótido que da lugar a una activación mitad de la activación máxima– y el coeficiente de Hill (n_H) se calcularon ajustando los datos obtenidos a una ecuación sigmoidal de pendiente variable, mediante la ayuda del programa «Prism» (Graph Pad).

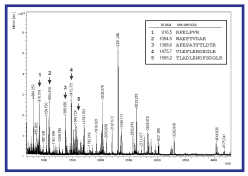
Las valores de las constantes de Michaelis-Menten aparentes (K_m) de la subunidad C para los sustratos «kemptide» y ATP se calcularon a partir de la representación de dobles recíprocos $1/V_o$ *vs* 1/[S], donde V_o es la velocidad inicial de reacción a una concentración de sustrato S determinada. El valor de $I_{0,5}$ para el péptido inhibidor PKI_{5-24} –concentración de péptido que reduce la velocidad de reacción en un 50%– se determinó a partir de la representación V_o *vs* [PKI_{5-24}] a concentraciones saturantes de sustratos.

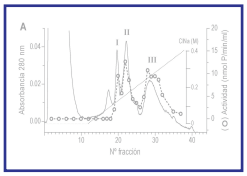
Los valores de la energía de activación (E_a) se determinaron a partir de las pendientes correspondientes a los plots de Arrhenius.

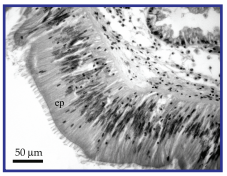
Para determinar las diferencias estadísticamente significativas, los datos se analizaron con la ayuda del programa «Instat» (Graph Pad), aplicando el test de la *t* de Student o el test de ANOVA, en el caso de comparaciones simultáneas de varias medias.

4 resultados y discusión









4.1. Determinación de la secuencia parcial de R_{myt2}

4.1.1. RESULTADOS

Con el fin de confirmar su identidad como una subunidad R tipo II, una muestra de R_{myt2} purificada se digirió con tripsina, y algunos de los péptidos resultantes se secuenciaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (tabla 4.1). En total se identificaron 159 aminoácidos, aproximadamente un 40% de la secuencia completa de la proteína.

Tabla 4.1. Secuencia de algunos péptidos resultantes de la digestión tríptica de R_{myt2}, obtenida mediante MALDI-TOF/TOF-MS

Péptido nº	*Secuencia*[1]
1	DFTVAVŁR
2	QFAADYFAK
3	HŁŁŁFR
4	SŁEPEQMQEVŁDAMFEK
5	VŁPDEHVŁDQGDDGDNFYVŁDSGK
6	FDNSGSFGEŁAŁŁYNMPR
7	MYEQŁŁEGVPVŁK
8	AŁEŁYER
9	QNVADAQFSK
10	GGYFGEŁAŁVTHKPR
11	AASVYAVGR
12	VAVŁDVEAFQR
13	YEEQŁVQVFGSK

[1] *Ł puede ser Leu o Ile, dado que poseen la misma masa molecular y son indistinguibles en secuenciación por MALDI-TOF/TOF-MS.*

El grado de identidad entre las secuencias de R_{myt2}, en su conjunto, y las secuencias correspondientes de subunidades R tipo II fue el siguiente: 64,8% con RIIα humana (UniProt P13861), 66,0% con RIIβ humana (UniProt P31323), 66,7% con RII de *Drosophila* (UniProt P81900) y 73,6% con RII de *Aplysia* (UniProt Q6TU32). En cambio, el porcentaje de identidad con subunidades R tipo I de las mismas fuentes oscila en un rango entre 32,0 – 37,6% (UniProt P10664, P31321, P16905 y P31319).

En la Fig. 4.1A se muestra el alineamiento de las secuencias de los péptidos de R_{myt2} con las regiones homólogas de la isoforma RIIα humana. Como se observa, los péptidos 1 y 2 se ubican en

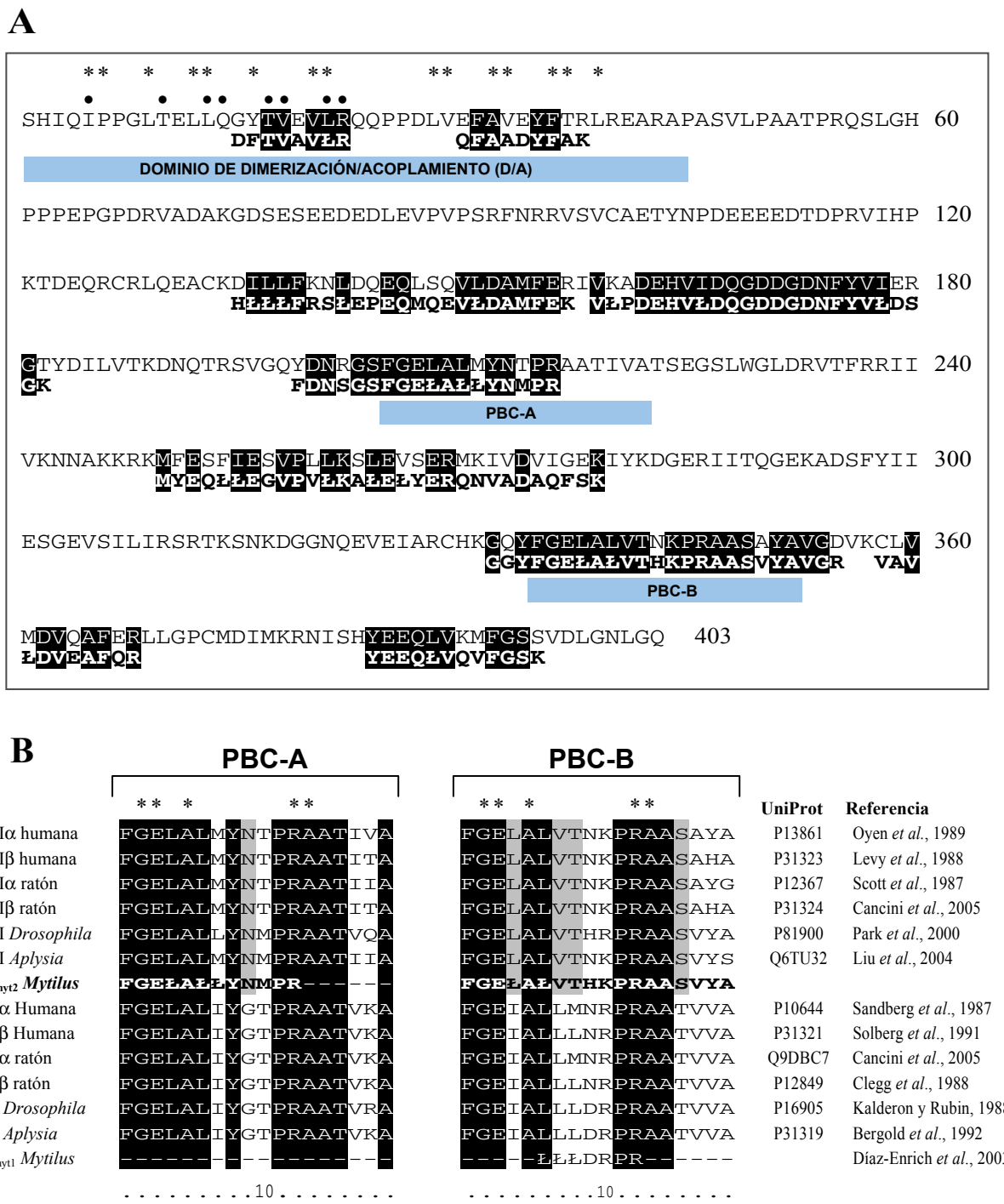


Figura 4.1. Análisis de la secuencia parcial de R_{myt2}. (**A**) Comparación de las secuencias de los péptidos de R_{myt2} (en negrita) con las regiones homólogas de la subunidad RIIα humana (UniProt P13861). Los aminoácidos idénticos se sitúan en cajas negras. Los asteriscos y los puntos indican, respectivamente, aminoácidos cruciales en la función de dimerización de RIIα y en su interacción con AKAPs (Banky *et al*., 2000). (**B**) Alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a los PBC-A y B de diferentes subunidades RI y RII. Los residuos invariables se sitúan en cajas negras, y los conservados sólo en subunidades RII se remarcan en gris. Los asteriscos indican aminoácidos que interactúan directamente con el AMPc (Canaves y Taylor, 2002) y los guiones representan aminoácidos no identificados. La posición relativa de cada aminoácido en el PBC se indica en la parte de abajo de la figura. «Ł » indica Leu o Ile, indistinguibles por el método de secuenciación.

el dominio de dimerización/acoplamiento (D/A) N-terminal de la proteína y contienen algunos aminoácidos invariables que son cruciales para la dimerización de RIIα y para su interacción con proteínas de anclaje (AKAPs). Por otra parte, las secuencias del péptido 6 y de los péptidos 10–11 emparejan, respectivamente, con las regiones denominadas «casete de unión de fosfato» (PBC) A y B, situadas en los dominios A y B de unión de AMPc de RIIα. Estas secuencias poseen el mayor porcentaje de residuos idénticos entre las subunidades R humana y de mejillón.

La figura 4.1B muestra el alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a las regiones PBC-A y PBC-B de diferentes subunidades R tipo I y II, incluidas las dos isoformas de *Mytilus*. Se puede observar que la mayor parte de los aminoácidos de ambos PBCs, incluyendo aquéllos que interactúan directamente con el AMPc (señalados con un asterisco), son invariables tanto en subunidades RI como RII. Sin embargo, otros aminoácidos, en particular Asn^{9} en el PBC-A, y Leu^{4}, Val^{7}, Thr^{8} y Ser^{15} en el PBC-B (en cajas grises), están conservados sólo en subunidades tipo II, incluida R_{myt2}.

4.1.2. DISCUSIÓN

Recientemente, Canaves y Taylor (2002) propusieron una clasificación general de las subunidades R de la PKA, basada en sus secuencias, en cuatro grupos: RI y RII (de animales), RIII (de hongos) y RIV (de protozoos). En los últimos años, en nuestro laboratorio, hemos identificado y purificado dos isoformas diferentes de subunidad R en *M. galloprovincialis*, a las que denominamos R_{myt1} y R_{myt2}, ya que muestran unas propiedades fisicoquímicas y bioquímicas típicas de las subunidades R tipo I y tipo II de mamíferos, respectivamente. Así por ejemplo, sólo R_{myt1} posee puentes disulfuro que participan en la formación del dímero, pero en cambio, solamente R_{myt2} puede ser fosforilada por la subunidad C (Cao *et al*., 1995a; 1996; Rodríguez *et al*., 1998; Díaz-Enrich *et al*., 2003). De acuerdo con su propiedades, las secuencias de diferentes péptidos procedentes de la digestión tríptica de R_{myt1} poseen una notable homología con regiones de subunidades RI de mamíferos, lo que nos permitió clasificar esta isoforma como una subunidad tipo I (Díaz-Enrich *et al*., 2003).

Ahora, **los datos de secuencia aportados en el presente trabajo demuestran que la isoforma R_{myt2} puede ser clasificada inequívocamente como una subunidad R tipo II**. Esta afirmación se basa en las siguientes observaciones: (*i*) el porcentaje de identidad entre las secuencias de los péptidos de R_{myt2}, en su conjunto, y la secuencia de diferentes subunidades RII oscila entre 65–75%; en cambio, el porcentaje de identidad global con la secuencia de subunidades RI sólo se aproxima al 35%; (*ii*) el alineamiento múltiple de las secuencias correspondientes a los PBCs A y B muestra

que R_{myt2} contiene algunos aminoácidos conservados sólo subunidades RII pero no en subunidades RI (Fig. 4.1B, cajas grises); y (*iii*) todos los péptidos de R_{myt2} tienen secuencias homólogas en subunidades RII, pero algunos de ellos no tienen homología en subunidades RI. Por ejemplo los péptidos 1 y 2 que emparejan con secuencias localizadas en el dominio de dimerización/acoplamiento (D/A) N-terminal de RII de mamíferos.

El alineamiento de secuencias de los péptidos 1 y 2 de R_{myt2} con las regiones homólogas de RIIα humana muestra que **ambas proteínas comparten algunos aminoácidos que son críticos para la dimerización de RIIα**: Val^{20}, Leu^{21}, Ala^{32} y Phe^{36} (Banky *et al*., 2000); sin embargo, algunos otros aminoácidos, también esenciales para la dimerización de RIIα, como Tyr^{16}, Val^{33} y Thr^{37} están sustituidos en R_{myt2} por Phe, Ala y Ala respectivamente. Este hecho explica la incapacidad de R_{myt2} para formar heterodímeros con RIIα, observada previamente por nosotros (Cao *et al*., 1996). Por otra parte, **R_{myt2} contiene también algunos residuos muy conservados, que son cruciales para la interacción específica de RIIα con las proteínas de anclaje AKAPs**: Thr^{17}, Val^{18}, Leu^{21} y Arg^{22} (Banky *et al.,* 2000) (ver figura 4.1A). Sin embargo, experimentos realizados anteriormente en nuestro laboratorio, demostraron que R_{myt2}, a diferencia de RIIα, no reconoce específicamente ninguna proteína de anclaje, lo que sugiere que la subunidad R de mejillón carece probablemente de otros residuos clave necesarios para esta función.

En cuanto a las regiones PBC**, R_{myt2} posee**, como era de esperar, **la secuencia consenso compartida por todos los miembros de la familia PKA** y que, según Canaves y Taylor (2002), es suficiente para clasificar una proteína como una subunidad R (ver figura 4.1B). Esta secuencia consenso es la siguiente: **F-G-E-[LIV]-A-L-[LIMV]-X**(3)-**[PV]-R-[ANQV]-A**, donde «X» representa cualquier aminoácido, y entre corchetes se muestran residuos que pueden ocupar una misma posición. En esta secuencia se incluye la Ala que ocupa la posición 14, responsable de la selectividad de la subunidad R para AMPc *vs* GMPc (Zorn *et al*., 1995; Canaves y Taylor, 2002). Como se puede observar en la figura 4.1B, R_{myt2} conserva una Ala en esta posición del PBC-B, y de acuerdo con ello, la holoenzima de *Mytilus* que contiene R_{myt2} como subunidad R muestra una afinidad 140 veces mayor por AMPc que por GMPc (ver resultados apartado 4.4.1.2; Bardales *et al*., 2004).

4.2. Caracterización de R_{myt1} y R_{myt2}: fosforilación por CK2

4.2.1. RESULTADOS

4.2.1.1. Fosforilación de R_{myt2} por CK2

Con el fin de conocer si las isoformas de subunidad R de mejillón pueden ser fosforiladas *in vitro* por la proteína quinasa CK2, sendas muestras de R_{myt1} y de R_{myt2} purificadas se incubaron, en presencia de GTP, con la subunidad catalítica de CK2 (CK2α) o con la holoenzima CK2 (CK2α + CK2β). Como control positivo de fosforilación, se incubó una muestra de β-caseína en idénticas condiciones.

Como se observa en la figura 4.2A, panel inferior, CK2 puede fosforilar *in vitro* la isoforma R_{myt2} (calles 8–9), pero no la isoforma R_{myt1} (calles 5–6). Además, aunque la subunidad catalítica α de CK2 es suficiente para fosforilar R_{myt2}, el nivel de fosforilación aumenta notablemente en presencia de la subunidad reguladora β (calle 9 *vs* calle 8). Por tanto, aunque la subunidad CK2β no es estrictamente necesaria para fosforilar R_{myt2}, la convierte en un sustrato más adecuado de CK2α. Un comportamiento similar se observó en la fosforilación de β-caseína (calle 3 *vs* calle 2).

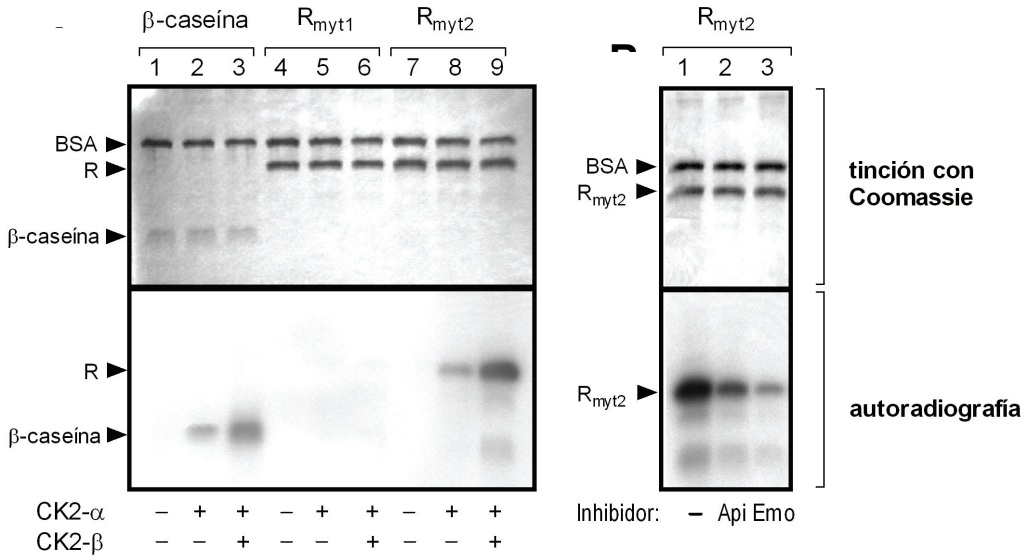


Figura 4.2. **Fosforilación por CK2 de las isoformas de subunidad R de mejillón**. (**A**) Muestras de β-caseína (0,5 µg), R_{myt1} (1,0 µg) y R_{myt2} (1,0 µg) se incubaron a 30 ºC, en presencia de Cl_2Mg, [γ-^{32}P]GTP, con CK2α (2 pmol) o con holoenzima CK2 (2 pmol). A los 30 minutos se pararon las reacciones añadiendo tampón de electroforesis desnaturalizante y calentando en un baño a ebullición 5–10 min. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE al 10% y el gel se tiñó con azul Coomassie (panel superior), y se expuso para autoradiografía (panel inferior). BSA, seroalbúmina bovina presente en el tampón usado como reconstituyente de CK2. (**B)** Muestras de R_{myt2} (1,0 µg) se incubaron 30 min a 30 ºC, con Cl_2Mg, [γ-^{32}P]GTP y la holoenzima CK2 (2 pmol) en ausencia y en presencia de de apigenina 50 µM o emodina 50 µM. Las muestras se analizaron como se describe en A.

Por otra parte, como se muestra en la figura 4.2B, el nivel de fosforilación de R_{myt2} por CK2 disminuyó significativamente en presencia de apigenina o emodina, dos conocidos inhibidores específicos de CK2 (Battistutta *et al*., 2000; Channavajhala y Seldin, 2002).

4.2.1.2. Estequiometría de fosforilación

La figura 4.3 representa el incremento del nivel de fosforilación de R_{myt2} *vs* tiempo de reacción. El proceso se llevó a cabo en presencia de CK2 y utilizando GTP como donante de fosfato. Como se observa, la incorporación de fosfato ocurrió de forma lenta, alcanzando un máximo de 0,86 ± 0,27 mol P/mol R_{myt2} a las 4 h de incubación.

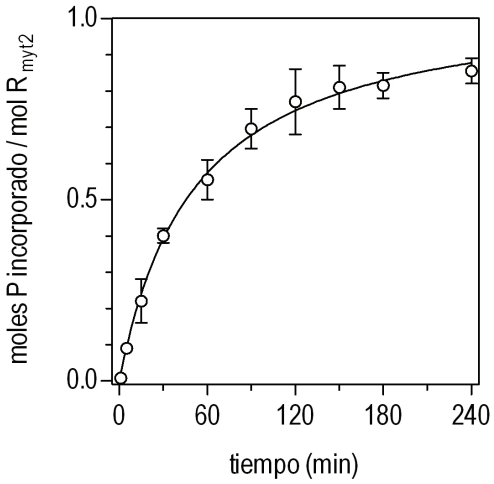


Figura 4.3. **Estequiometría de fosforilación de R_{myt2} por CK2.** Una muestra de R_{myt2} purificada se incubó a 30 ºC con Cl_2Mg, [γ-^{32}P]GTP y holoenzima CK2 (2 pmol/µg R). A los tiempos indicados, se retiraron alícuotas de 2 µg de R_{myt2} y se paró la reacción añadiendo tampón de electroforesis desnaturalizante y calentando en un baño a ebullición 5–10 min . Las muestras se analizron mediante SDS-PAGE al 10% y se determinó la cantidad de fosfato incorporado siguiendo el protocolo descrito en Material y métodos. Los datos son la media ± SEM de tres experimentos independientes.

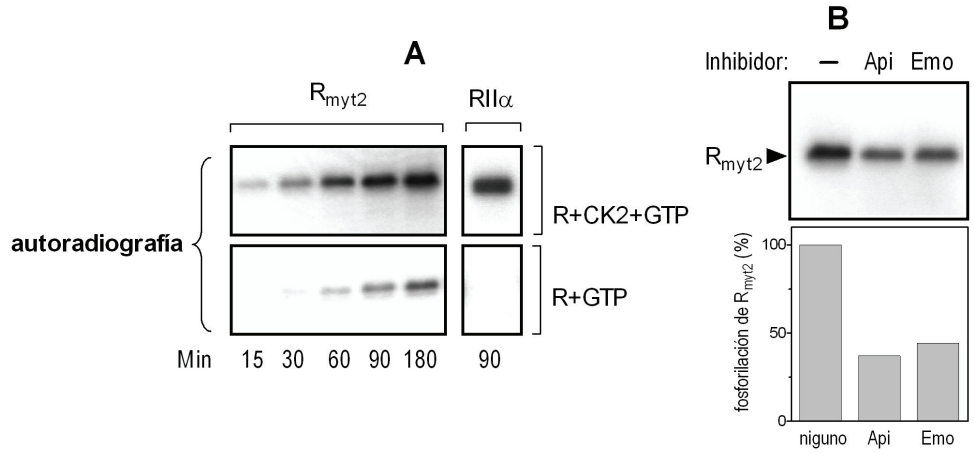


Figura 4.4. Fosforilación basal de R_{myt2}. (**A**) Se incubaron muestras de R_{myt2} y RIIα, purificadas a partir de manto de mejillón y de corazón de porcino respectivamente con Cl_2Mg y [γ-^{32}P]GTP, en ausencia (panel inferior) y en presencia (panel superior) de la holoenzima CK2 (2 pmol/µg R). A los tiempos indicados, se retiraron alícuotas (2 µg de R_{myt2} ó 3 µg de RIIα), que se analizaron mediante SDS-PAGE y autoradiografía. (**B**) Se incubaron muestras de R_{myt2} (1 µg) con Cl_2Mg y [γ-^{32}P]GTP (pero sin CK2), en ausencia y en presencia de apigenina 50 µM o emodina 50 µM. A las 3 h de incubación, se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE y autoradiografía. El panel inferior muestra el análisis densitométrico de la autoradiografía superior.

Curiosamente, se observó un cierto grado de fosforilación de R_{myt2} cuando la proteína de mejillón se incubó sólo con GTP, en ausencia de CK2 exógena (figura 4.4A, panel inferior). El nivel de fosforilación se incrementó con el tiempo de incubación a partir de 60 minutos. Es necesario destacar, además, que esta fosforilación basal de R_{myt2}, que ocurre en ausencia de CK2 exógena, fue claramente inhibida en presencia de apigenina o emodina (figura 4.4B).

Comparativamente, la subunidad R tipo IIα, purificada a partir de corazón porcino, también fue fosforilada por CK2, tal como habían demostrado previamente otros autores (Kosuge *et al*., 2003). Sin embargo, cuando la isoforma de mamífero se incubó durante 90 min con GTP, pero sin CK2 exógena, a diferencia de lo que ocurre con R_{myt2}, no se observó incorporación de ^{32}P a la proteína (panel inferior).

4.2.1.3. Actividad CK2 en extractos de mejillón

Con el fin de demostrar la presencia de actividad de CK2 en *M. galloprovincialis*, se incubaron muestras de un extracto de tejido de manto –obtenido como se describió en material y métodos– con [γ-^{32}P]GTP y con β-caseína o R_{myt2}, cuya fosforilación por CK2 habíamos observado previamente. Las incubaciones se llevaron a cabo en presencia y ausencia de inhibidores de CK2. Como se puede observar en la figura 4.5, tanto R_{myt2} (A) como β-caseína (B) fueron fosforiladas *in vitro* por una proteína quinasa presente en el extracto de mejillón (calle 1). Además, el nivel de fosforilación alcanzado fue notablemente menor cuando el proceso se llevó a cabo en presencia de inhibidores de CK2: apigenina (calle 2 *vs* calle1), emodina (calle 3 *vs* calle 1) o LY294002 (calle 4 *vs* calle1).

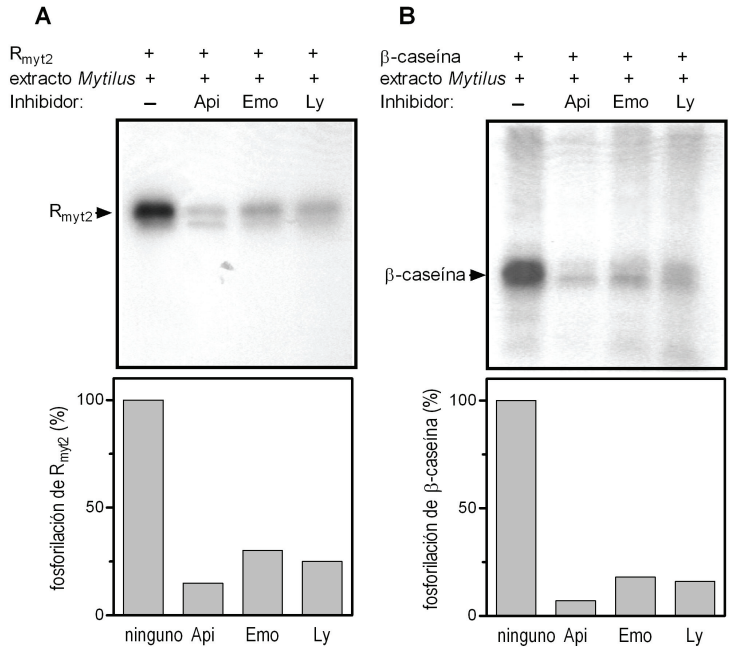


Figura 4.5. Actividad CK2 en extractos de mejillón. Se incubaron muestras (2 µg) de R_{myt2} (**A**) y β-caseína (**B**) durante 60 min con Cl_2Mg, [γ-^{32}P]GTP y una alícuota (10 µg proteína) de extracto crudo de tejido de manto de mejillón, en ausencia y presencia de apigenina, emodina o LY294002 (50 µM). Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE y los geles se expusieron para autoradiografía. Las figuras inferiores muestran el análisis densitométrico de las bandas correspondientes a R_{myt2} (izquierda) y a β-caseína (derecha).

4.2.1.4. Efecto de la fosforilación de R_{myt2} sobre su actividad biológica

R_{myt2} actúa como subunidad reguladora de la PKA, es decir, su función primordial consiste en inhibir la actividad fosfotransferasa de la subunidad C (Cao *et al*., 1995a), manteniendo la PKA en estado inactivo. Por tanto, en este trabajo nos planteamos investigar el efecto de la fosforilación de R_{myt2} –mediada por CK2– sobre su capacidad para inhibir la subunidad C. Para ello se determinó la actividad fosfotransferasa de la subunidad C, utilizando el péptido «kemptide» o histona tipo IIA como sustratos, en ausencia y en presencia de R_{myt2} no fosforilada, o fosforilada por CK2.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.6. Usando «kemptide» como sustrato, la actividad fosfotransferasa de la subunidad C es inhibida por concentraciones crecientes tanto de R_{myt2} no fosforilada como de proteína fosforilada (R_{myt2}-P) (figura 4.6A). Sin embargo, el nivel de la inhibición provocada por R_{myt2} fosforilada es notablemente inferior en comparación con la ejercida por R_{myt2} no fosforilada (círculos llenos *vs* círculos vacíos).

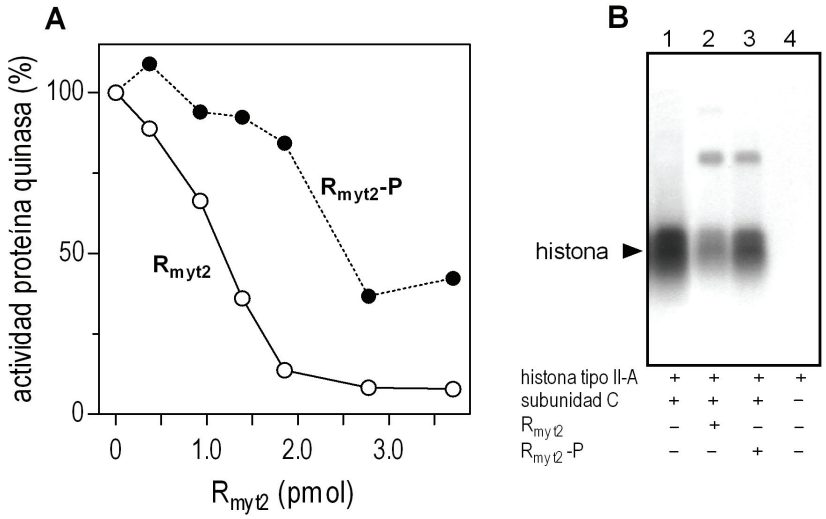


Figura 4.6. **Efecto de la fosforilación de R_{myt2} sobre su capacidad a inhibir la subunidad C**. (**A**) Se incubaron alícuotas de subunidad C purificada de manto de mejillón (1,2 pmol; actividad: 41.6 mol P/min/mol C) durante 10 min, con cantidades crecientes de R_{myt2} libre de AMPc, no fosforilada (círculos vacíos) o fosforilada previamente por CK2 en presencia de GTP (R_{myt2}-P, círculos llenos). La actividad fosfotransferasa de la subunidad C se determinó utilizando «kemptide» como sustrato, como se describe en Material y métodos. La gráfica representa los resultados de uno de los tres experimentos realizados, con resultados similares. (**B**) Se incubaron tres alícuotas de subunidad C (1.1 pmol), durante 10 minutos, con tampón (calle 1), con R_{myt2} libre de AMPc, no fosforilada (1.8 pmol, calle 2) o con R_{myt2} libre de AMPc previamente fosforilada por CK2 como se describió en Material y métodos (1.8 pmol, calle 3). A continuación, se añadió a cada muestra, incluida una que sólo contenía tampón (calle 4), una cantidad de 10 µg de histona tipo IIA y [γ-^{32}P]ATP 0.2 mM (520 cpm/pmol) y se continuó la incubación otros 10 min. Finalmente se pararon las reacciones y se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE al 12%. El gel se tiñó con azul de Coomassie y se expuso para autoradiografía.

Un resultado similar se obtuvo utilizando histona II A como sustrato. Como se observa en la figura 4.6B, cuando la histona IIA se incuba con [γ-^{32}P]ATP y subunidad C, la autoradiografía muestra una banda marcada correspondiente a la fosforilación de la histona (calle 1). Cuando la incubación se realiza en presencia de R_{myt2} no fosforilada, disminuye notablemente el grado de fosforilación de la histona (calle2 *vs* calle1); sin embargo esta disminución es mucho menor en presencia de R_{myt2} fosforilada (calle 3 *vs* calle1). En otras palabras, la fosforilación de R_{myt2} por CK2 disminuye notablemente su efecto inhibidor sobre la actividad quinasa de la subunidad C (calle 3 *vs* calle 2).

4.2.2. DISCUSIÓN

Desde hace tiempo se conoce que la subunidad R tipo IIα de mamíferos puede ser fosforilada *in vitro* por CK2, en presencia de ATP (Carmichael *et al*., 1982; Hemmings *et al*., 1982; Bidwai *et al*., 1993). Además, se identificó la Ser^{74} en la secuencia de RIIα bovina como el aminoácido fosforilado (Carmichael *et al*., 1982). Recientemente, otros autores investigaron de nuevo la fosforilación de la subunidad R por CK2, pero utilizando GTP como nucleótido donante del grupo fosfato. De esta manera, al omitir el ATP, y dado que el GTP es utilizado eficientemente sólo por CK2, se evita la posibilidad de que RIIα sea también fosforilada por la subunidad C (autofosforilación de la PKA), lo que podría enmascarar la fosforilación específica por CK2 (Kosuge *et al*., 2003). Sorprendentemente, estos autores encontraron que CK2 fosforila solamente residuos de Thr, tanto en RIα como en RIIα, y propusieron la Thr^{286} como el sitio de fosforilación en la secuencia de RIIα.

En el presente trabajo nosotros **mostramos por primera vez, la fosforilación *in vitro* por CK2 de una subunidad R procedente de un organismo no mamífero**. En efecto, la isoforma R_{myt2} de mejillón, que como hemos demostrado previamente es homóloga de la subunidad R tipo II de mamíferos, también es fosforilda *in vitro* por CK2, usando GTP como donante de fosfato. La estequiometría del proceso fue aproximadamente 1 mol de fosfato incorporado por cada mol de monómero R, lo cual sugiere que existe un sitio único de fosforilación. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, no hemos podido identificar el aminoácido fosforilado ni la secuencia en torno al sitio de fosforilación.

En mamíferos existen dos subtipos de subunidades R tipo I, denominadas RIα y RIβ. Nuestros resultados indican que la isoforma homóloga de mejillón, R_{myt1}, al contrario que la isoforma RIα bovina (Kosuge *et al*., 2003), no puede ser fosforilada *in vitro* por CK2, bajo las mismas condiciones experimentales usadas con R_{myt2}. Aunque el grado de homología de la secuencia parcial de R_{myt1} con RIα y RIβ es similar, sus propiedades físicas e inmunológicas indican que se

parece más a RIβ que a RIα (Díaz-Enrich et al., 2003). Por lo tanto, dado que no existen datos en relación con RIβ, sería interesante investigar si esta isoforma de mamíferos puede ser fosforilada por CK2.

La subunidad catalítica CK2α, por sí misma, fue suficiente para fosforilar R_{myt2}, aunque el nivel de fosforilación alcanzado fue notablemente mayor cuando se utilizó holoenzima CK2, formada por la asociación de dos subunidades catalíticas CK2α y dos subunidades reguladoras CK2β. Por tanto, **R_{myt2} puede ser considerada como un sustrato de clase I de la CK2**, según la clasificación de Pinna (2002).

Un hecho interesante que merece ser destacado es la fosforilación basal de R_{myt2}. A diferencia de lo que ocurre con RIIα, **la isoforma de mejillón sufre un cierto grado de fosforilación cuando se incuba con GTP, en ausencia de CK2 exógena**. Existen, en principio, dos posibles explicaciones para este hecho. (*a*) En primer lugar, la fosforilación basal podría ser debida a la presencia de subunidad C de la PKA en la preparación de R_{myt2} purificada. Aún cuando R_{myt2} se purificó mediante una cromatografía de AMPc–agarosa, que conlleva la disociación de la holoenzima PKA, es posible que una cantidad residual de subunidad C permanezca unida a R, y en ese caso, podría ocurrir la fosforilación de R_{myt2} mediante autofosforilación (Cao *et al*., 1995a). Sin embargo, esta posibilidad puede descartarse por la siguiente razón: la fosforilación basal de R_{myt2} ocurre utilizando GTP como donante de fosfato y este nucleótido sólo es usado de manera eficiente por CK2, pero no por la subunidad C de PKA (Akamine *et al*, 2003). De hecho, cuando utilizamos GTP y «kemptide» como sustratos, no hemos detectado actividad quinasa en la preparación purificada de R_{myt2} (resultado no mostrado), lo que indica que, aunque existiera una cierta cantidad residual de subunidad C en esta preparación, no podría utilizar GTP como donante de fosfato. (*b*) Una segunda posibilidad es que **la fosforilación basal de R_{myt2} sea debida a la presencia de una cantidad residual de CK2 en la preparación de la subunidad R de mejillón**. Esta hipótesis es apoyada por los siguientes hechos experimentales: (*i*) hemos detectado actividad CK2 en extractos de manto de mejillón, capaz de fosforilar tanto R_{myt2} como β-caseína, en presencia de GTP; además se ha demostrado en varios casos que la CK2 co-purifica con sus sustratos (Gotz et al., 1995; Wada et al., 1996; Sawa et al., 2004); (*ii*) la fosforilación basal de R_{myt2} ocurre con GTP como donante de fosfato, y este nucleótido puede ser usado de manera eficiente sólo por CK2 (Akamine et al., 2003); y (*iii*) la fosforilación basal es parcialmente inhibida en presencia de emodina o apigenina, dos inhibidores de la actividad CK2 (Battistutta *et al*., 2000; Channavajhala y Seldin, 2002). En contra de esta hipótesis está el hecho de que la utilización de un anticuerpo comercial anti-CK2α de mamífero, en una inmunotransferencia, no detectó la presencia de ninguna proteína con peso molecular similar a CK2α, ni en la preparación de $R_{myt}2$ purificada ni en un extracto crudo de

manto mejillón (resultado no mostrado), aunque este resultado negativo podría ser debido a la diferente antigenicidad de la CK2 de mamífero y de mejillón.

Los trabajos iniciales sobre la fosforilación de la subunidad R de mamíferos por CK2 ponían en duda la importancia fisiológica de este proceso (Carmichael *et al*., 1982). Sin embargo, los estudios más recientes han puesto de manifiesto que la fosforilación por CK2 de RIIα de corazón bovino disminuye significativamente su capacidad para inhibir la actividad quinasa de la subunidad C (Kosuge *et al*., 2003). Además, los mismos autores demostraron que tanto la PKA tipo I como la PKA tipo II se activan cuando sus subunidades R –RIα y RIIα, respectivamente– se hallan completamente fosforiladas por CK2, de tal manera que pueden fosforilar eficientemente la proteína «HBV-core», aún en ausencia de AMPc, el activador clásico de la PKA (Enomoto *et al*., 2006). Los resultados de nuestro trabajo, presentados en este apartado, muestran que, al igual que ocurre con subunidades R de mamíferos**, la fosforilación de R_{myt2} de mejillón por CK2** también **disminuye notablemente su capacidad para inhibir la actividad quinasa de la subunidad C**.

En resumen, los datos experimentales más recientes apoyan la existencia de **un mecanismo de activación de PKA mediante fosforilación de su subunidad R por CK2**, que podría ser complementario a la clásica activación alostérica de la enzima por AMPc. Además, este nuevo mecanismo de activación no es exclusivo de la enzima de mamíferos.

4.3. Distribución tisular de R_{myt1} y R_{myt2}

4.3.1. RESULTADOS

Para profundizar en la caracterización funcional de las isoformas de PKA nos planteamos como objetivo estudiar la distribución de R_{myt1} y R_{myt2} en diferentes tejidos del molusco, utilizando para ello los anticuerpos anti-R_{myt1} y anti-R_{myt2} obtenidos previamente por nosotros. Como se muestra en la figura 4.7, a las diluciones empleadas, no se observó apenas reactividad cruzada en un rango entre 25-250 ng de antígeno, lo que demuestra que cada anticuerpo es específico para su correspondiente isoforma de subunidad R.

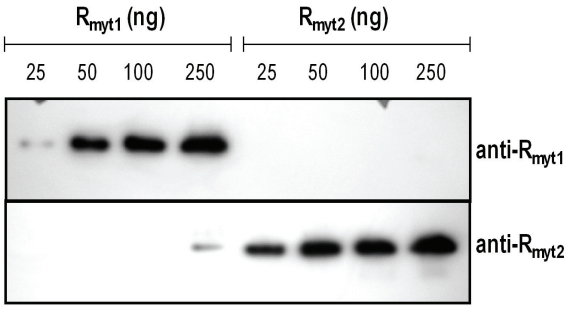


Figura 4.7. Análisis de la especificidad de los anticuerpos anti-R_{myt1} y anti-R_{myt2}. La reactividad cruzada de los anticuerpos se determinó mediante inmunotransferencia con cantidades crecientes de R_{myt1} y R_{myt2} purificadas.

El estudio de la distribución tisular de R_{myt1} y R_{myt2} se llevó a cabo, en una primera aproximación experimental, analizando mediante inmunotransferencia, muestras de extractos crudos –citosólicos o de membrana– procedentes de los siguientes tejidos del molusco: manto, glándula genital (joroba de polichinela), glándula digestiva (hepatopáncreas), branquias, pie, MAP, MARB y hemocitos. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 4.8. Es necesario señalar, como aclaración previa, que el anticuerpo anti-R_{myt1} detecta, además de la isoforma R_{myt1} de 54 kDa, una proteína de 40 kDa que se corresponde con un fragmento generado por proteolisis de R_{myt1}, tal como hemos demostrado en trabajos previos; cantidades significativas de esta proteína de 40 kDa se detectan sistemáticamente en el proceso de purificación de R_{myt1}, a pesar de la utilización de inhibidores de proteasas, por lo que no se puede descartar que la proteolisis ocurra *in vivo*, como un mecanismo para regular la concentración de R_{myt1} activa en los tejidos (Rodríguez et al., 1998; Díaz-Enrich et al., 2003).

Como se observa en la figura 4.8, los tejidos de manto y gónada contienen mayoritariamente la isoforma R_{myt2}, distribuida entre citosol y fracción membranosa, aunque en los extractos

citosólicos de estos dos tejidos también se detectó una cantidad mínima de R_{myt1}, o más precisamente, de la proteína p40 generada a partir de ella. Cabe destacar también el hecho de que, en tejido de manto, la isoforma R_{myt2} se halla mayoritariamente asociada a extractos no citosólicos.

Al contrario de lo que ocurre en manto y gónada, los tejidos de MAP, MARB y glándula digestiva contienen mayoritariamente la isoforma R_{myt1}, aunque en los extractos citosólicos de ambos músculos «catch» se detectó también la presencia de una cantidad minoritaria de R_{myt2} (aunque en la fotografía que se muestra no se aprecia, la presencia de R_{myt2} en extracto de MAP sí es detectable en la mayoría de los análisis realizados). En la glándula digestiva, se detectó mayoritariamente el fragmento p40 en lugar de R_{myt1}; este hecho es debido, probablemente, a la abundante presencia de proteasas digestivas presentes en el tejido que hidrolizan la isoforma R_{myt1} durante el proceso de extracción. Se destaca el hecho de que la presencia de la isoforma R_{myt1} en los tres tejidos es mayoritariamente citosólica.

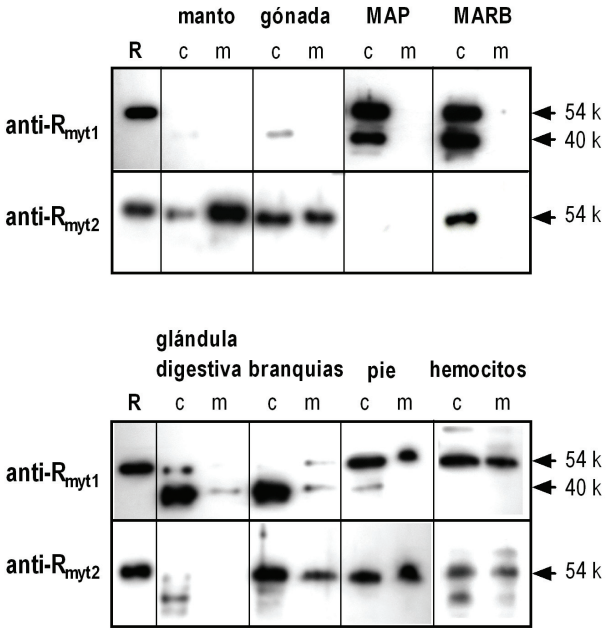


Figura 4.8. Análisis de la distribución tisular de R_{myt1} y R_{myt2} mediante inmunotransferencia. Muestras de extractos citosólicos (c) y de membrana (m) de diferentes tejidos de mejillón se sometieron a SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% y se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-R_{myt1} y anti-R_{myt2}. En muestras de manto, gónada, MAP y MARB se aplicaron 50 µg de proteína; en muestras de glándula digestiva, branquias y pie se aplicaron 300 µg de proteína; en muestras de hemocitos se aplicaron 70 µg de proteína. R, control de subunidad R: 50 ng de R_{myt1} o de R_{myt2} purificadas.

Los tejidos de branquias y pie, y los hemocitos contienen ambas isoformas de subunidad R en cantidades similares o con ligero predominio de R_{myt1} sobre R_{myt2}. De nuevo, la isoforma R_{myt1} predomina en el citosol mientras que la isoforma R_{myt2} se distribuye, a partes iguales, entre citosol y membrana, excepto en branquias, donde es mayoritariamente citosólica. En branquias, al igual que ocurre en la glándula digestiva, se detecta mayoritariamente la proteína p40, probablemente debido a la proteolisis de R_{myt1} en el proceso de extracción.

En resumen, el análisis mediante inmunotransferencia muestra que la isoforma R_{myt2} es mayoritaria en manto-gónada, mientras que la isoforma R_{myt1} lo es en músculos «catch» y glándula digestiva. Estos datos no resultaron sorprendentes para nosotros ya que, de hecho, R_{myt2} y R_{myt1} se purificaron inicialmente a partir de manto y MAP respectivamente (Cao et al, 1995; Rodríguez et al., 1998).

Una vez obtenida esta información inicial, y dado que los tejidos analizados contienen diferentes poblaciones celulares, se realizó un análisis más detallado de la distribución tisular de R_{myt1} y R_{myt2}, utilizando técnicas de marcaje inmunológico en cortes histológicos de los diferentes tejidos. Los resultados del análisis inmuohistoquímico se muestran en la figura 4.9 (láminas A-P).

A. Epitelio externo de la glándula genital o joroba de polichinela: se trata de un epitelio simple cúbico y ciliado en el que abundan diferentes tipos de células mucosas y/o secretoras. En este epitelio se detectó expresión tanto de R_{myt1} como de R_{myt2} en un tipo de células con gránulos de secreción (cs), así como en las células epiteliales (cep); en este caso, R_{myt1} se localiza en toda célula o en su zona apical, mientras que la presencia de R_{myt2} parece restringida al borde celular apical y a las estructuras ciliares (ci). Solamente la isoforma R_{myt2} se expresa en un tipo de células secretoras de *mucus*, con una apariencia externa reticulada, a las que denominamos mucocitos tipo I (mu I) para diferenciarlas de otra población de mucocitos de menor tamaño y apariencia lisa, que se señalan con una punta de flecha en la lámina A2; como se observa en el inserto, R_{myt2} se localiza en la periferia celular de los mucocitos I. Fuera del epitelio también se observa una abundante expresión de R_{myt2} en el tejido conjuntivo subepitelial (tc) y en las células vesiculares almacenadoras de glucógeno (cv) que forman parte del tejido conjuntivo de reserva; en este caso, la localización de R_{myt2} se restringe a la región perinuclear y a la periferia celular. Este hecho podría ser debido al tratamiento de los cortes histológicos con solventes orgánicos –etanol, xilol etc.– que disuelve los gránulos de glucógeno citoplasmáticos y genera grandes vacuolas en el interior de estas células.

B. Epitelio externo del manto: como se observa en la lámina B, se trata de un epitelio pseudoestratificado cúbico y ciliado, que contiene diferentes poblaciones celulares. Se detectó la presencia de la isoforma R_{myt1} en las células epiteliales (cep) y, en mayor nivel, en los numerosos hemocitos (he) presentes tanto en el epitelio como en el tejido conjuntivo subepitelial. La localización de R_{myt2} es mucho más amplia, detectándose expresión de esta isoforma en los cilios de las células epiteliales (ci), en mucocitos tipo I (mu I), y sobre todo, en una población de células redondeadas (c?), localizadas entre las células del epitelio pseudoestratificado, y que no expresan R_{myt1} (señaladas con puntas de flecha en la lámina B1). También se detectó la presencia de R_{myt2} en

el tejido conjuntivo subepitelial (tc), en el tejido conjuntivo de reserva (células adipogranulares y vesiculares) y en hemocitos, aunque en este caso el nivel de expresión es relativamente bajo en comparación con R_{myt1}.

C, D. Gónada femenina y ovocitos. En la lámina C se muestra sendos cortes de tejido de manto de un mejillón ♀, donde se observan folículos gonadales rodeados de tejido conjuntivo de reserva. Solamente se detectó una abundante expresión de la isoforma R_{myt1} en las células auxiliares del folículo (caf) y también en la numerosa población de hemocitos (he) que se encuentran entre el tejido conjuntivo. En cambio, tanto en células adipogranulares (cadg) como vesiculares (cv), que constituyen el tejido conjuntivo de reserva, se detectó únicamente la presencia de la isoforma R_{myt2}; en células vesiculares, R_{myt2} aparece localizada en la periferia celular y en la región perinuclear.

Es de destacar la ausencia tanto de R_{myt1} como de R_{myt2} en los ovocitos –en cualquier estadio de maduración– dentro del folículo. Sin embargo, curiosamente, en ovocitos recogidos de agua de mar, una vez inducido el desove, se observa una fuerte expresión de R_{myt1}, distribuida por todo el citoplasma celular (lámina D1); también se detecta, en menor medida, la presencia de R_{myt2}, fundamentalmente en la periferia celular (lámina D2). La inducción de la síntesis de subunidad R se produce, al menos en el caso de R_{myt1}, en un ovocito donde todavía no ha desparecido la membrana nuclear, es decir antes de iniciarse el proceso de división celular que sigue a la fecundación (a). El patrón y nivel de expresión se mantiene una vez producida la fecundación (b) y durante las primeras divisiones celulares (mórula, c).

E. Gónada masculina : en la lámina E se muestran cortes histológicos de tejido de manto de un mejillón ♂ donde se observa un folículo gonadal con células sexuales en diferentes estadios de diferenciación. Como se puede observar, se detectó solamente la presencia de la isoforma R_{myt2}, localizada en los flagelos (f) de los espermatozoides (spz), así como en la pared del folículo donde se distinguen células mioepiteliales alargadas (cmep) y células auxiliares, con forma triangular, equivalentes a las células de Sertoli (caf). No se observa expresión de R_{myt1} ni en las células sexuales ni en las células auxiliares.

F, G. Pliegues del borde del manto: tanto en el pliegue medio (lámina F) como en el pliegue externo (lámina G) del borde del manto, R_{myt1} y R_{myt2} tienen un patrón de distribución complementario. En el pliegue medio (F), se detectó la presencia exclusiva de R_{myt1} en las células del epitelio cilíndrico simple y ciliado (epci) que constituye la superficie externa festoneada de dicho pliegue, y en menor medida, en las células epiteliales ciliadas de la superficie interna lisa

(parte convexa). Por su parte, como se observa en la lámina F2, la isoforma R_{myt2} se localiza en el tejido conjuntivo subepitelial (tc) –con una mayor presencia en la zona más próxima al epitelio– así como en el borde apical y en los cilios (ci) de las células epiteliales de la superficie interna lisa. Curiosamente, no se detectó la presencia de R_{myt2} en los cilios del epitelio de la superficie festoneada externa (insertos de lámina F2, punta de flecha). Finalmente, en hemocitos (he) y en un tipo de células redondeadas localizadas en el epitelio (c?), que podrían ser células mucosas u otro tipo de células secretoras, coexisten tanto R_{myt1} como R_{myt2}, aunque con mayor expresión de la isoforma R_{myt1}.

El patrón de distribución en el pliegue externo es similar, con R_{myt1} localizada en las células epiteliales y en las fibras musculares (fm), y R_{myt2} en los cilios (ci) del epitelio y en el tejido conjuntivo (tc). Destaca también la presencia de numerosos hemocitos en el tejido conjuntivo, y de algunas células redondeadas (c?) en la base del epitelio. En ambos tipos de células se detectó la presencia tanto de R_{myt1} como de R_{myt2}.

H, I. Músculos «catch»: tanto en las fibras del MARB (lámina H, corte longitudinal) como en las del MAP (lámina I, corte transversal) se observó abundante expresión de la isoforma R_{myt1}, distribuida de forma uniforme a lo largo de toda la fibra (fm). El marcaje inmunohistoquímico también reveló la presencia de R_{myt2} en ambos tipos de fibras, pero en este caso, con una localización restringida a la periferia de la fibra muscular. En la lámina H1 y H2 se puede observar también un vaso de hemolinfa que contiene numerosos hemocitos (he), los cuales, como también se puede observar en cortes de otros tejidos mostrados previamente, expresan tanto R_{myt1} como R_{myt2}.

Los resultados de la tinción inmuohistoquímica de MARB y MAP concuerdan con los datos obtenidos del análisis de inmunotransferencia realizado con muestras de extractos de ambos tejidos, que revelaban la presencia mayoritaria de R_{myt1} en comparación con R_{myt2}.

J. Palpos labiales: en la lámina J se muestran sendos cortes histológicos de los palpos labiales. De nuevo, se puede observar la localización de R_{myt1} en la zona apical de las células que constituyen el epitelio cilíndrico simple o pseudoestratificado –según la zona observada– de la superficie festoneada (ep). Sin embargo, la expresión más abundante de R_{myt1} tiene lugar en la numerosa población de células secretoras de *mucus* localizadas en dicho epitelio (mu). Por su parte, R_{myt2} se localiza fundamentalmente en los cilios de las células epiteliales (ci) y en las células vacuoladas (cv) del tejido conjuntivo situado entre los epitelios de ambas caras del palpo. Se destaca que, en estas células, al igual que ocurría con las células vesiculares en el tejido de manto, la localización de R_{myt2}

es perinuclear y en la periferia celular. También se puede observar la presencia de R_{myt2} en las células mucosas del epitelio, aunque su nivel de expresión es notablemente menor en comparación con R_{myt1}.

K, L. Aparato digestivo: la lámina K corresponde a un corte histológico del aparato digestivo en el que se observa una sección transversal del intestino medio y de la glándula digestiva que lo rodea. Como se puede observar, se detectó expresión de R_{myt1} en las células ciliadas del epitelio intestinal (ep), que es especialmente abundante en la zona apical, tal como se observa en la imagen ampliada de la lámina L1. También se detectó la presencia de R_{myt1} en las células que constituyen los divertículos de la glándula digestiva (dgd), que rodea el estómago y una parte del intestino. En las láminas K2 y L2 se puede observar que la presencia de la isoforma R_{myt2} es muy escasa en los tejidos del aparato digestivo, localizándose únicamente en el tejido conjuntivo de almacenamiento (tca) –células vesiculares y adipogranulares– situado entre los divertículos de la glándula digestiva.

Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos del análisis de inmunotranferencia que indicaban la presencia casi exclusiva de la isoforma R_{myt1} en extractos de glándula digestiva.

M. Branquias. En los cortes histológicos de la lámina M se puede apreciar de nuevo la expresión complementaria de R_{myt1} y R_{myt2} en las diferentes poblaciones celulares de los filamentos branquiales. Se observa la presencia de R_{myt1} en las células epiteliales de los filamentos, tanto las que forman la cara afrontal aciliada (CA), como las que constituyen la cara frontal (CF), clasificadas en ciliadas laterales (cl), ciliadas frontolaterales (cfl) y ciliadas frontales (cf). También se detectó la presencia de R_{myt1} en la numerosas células secretoras de *mucus* (mu) localizadas mayoritariamente en la cara afrontal, y en los abundantes hemocitos (he) que circulan en el espacio lagunar interno de los filamentos. Por su parte, la isoforma R_{myt2} se localiza en los cilios –sobre todo de las células frontales– y en las células del tejido conjuntivo fibroso (f) que constituye, junto con la denominada estructura quitinosa de sostén (eq) –señalada con una punta de flecha en la lámina M2– la parte central del filamento branquial.

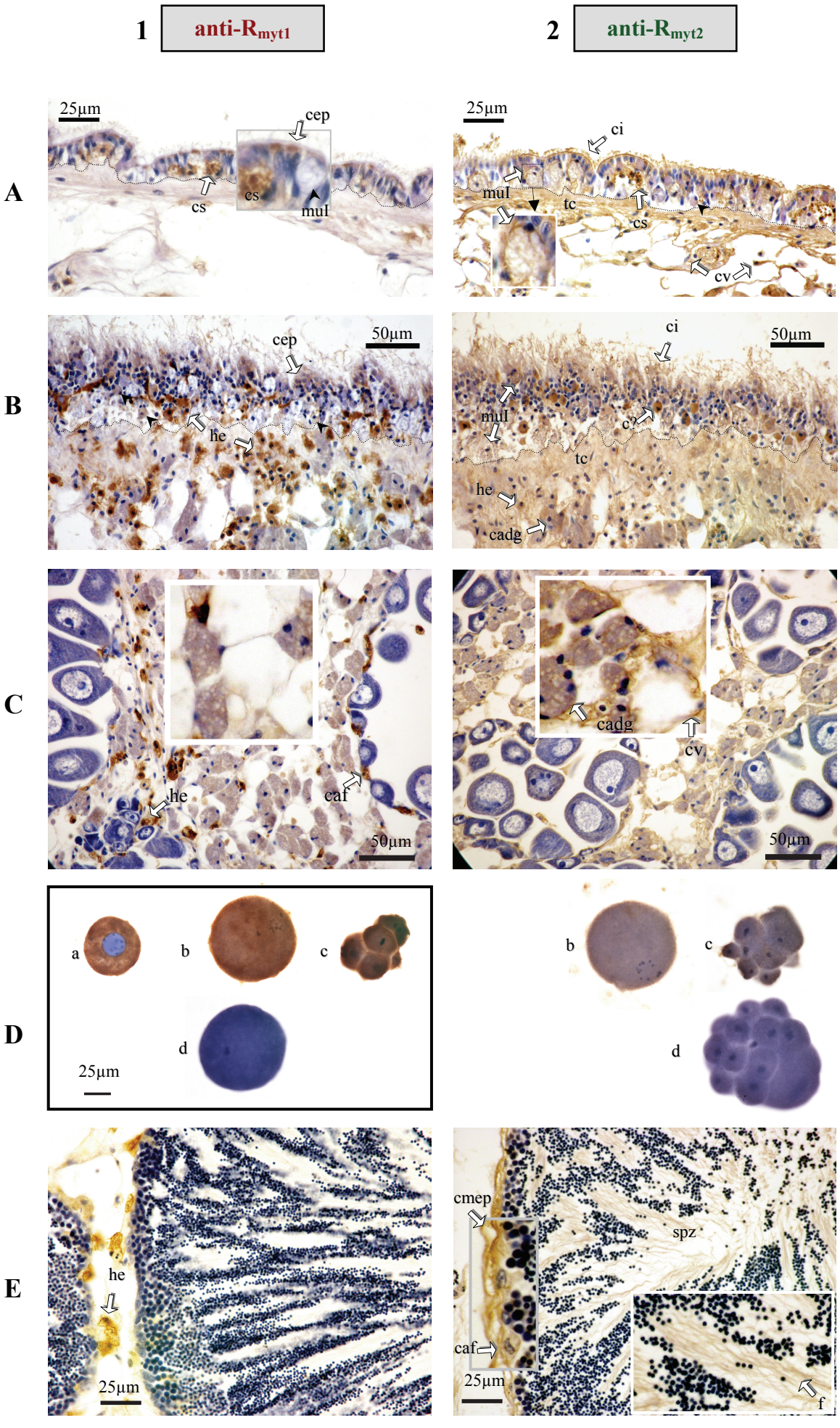
N-P. Pie y glándula(s) secretora(s) del biso. El pie es un órgano con una estructura bastante compleja puesto que además de su carácter muscular contiene diferentes glándulas implicadas en la formación de las hebras del biso (ver introducción, apartado 1.4.3.8.). Las láminas N-P muestran los resultados de la inmunotinción realizada en un corte longitudinal y transversal de este tejido.

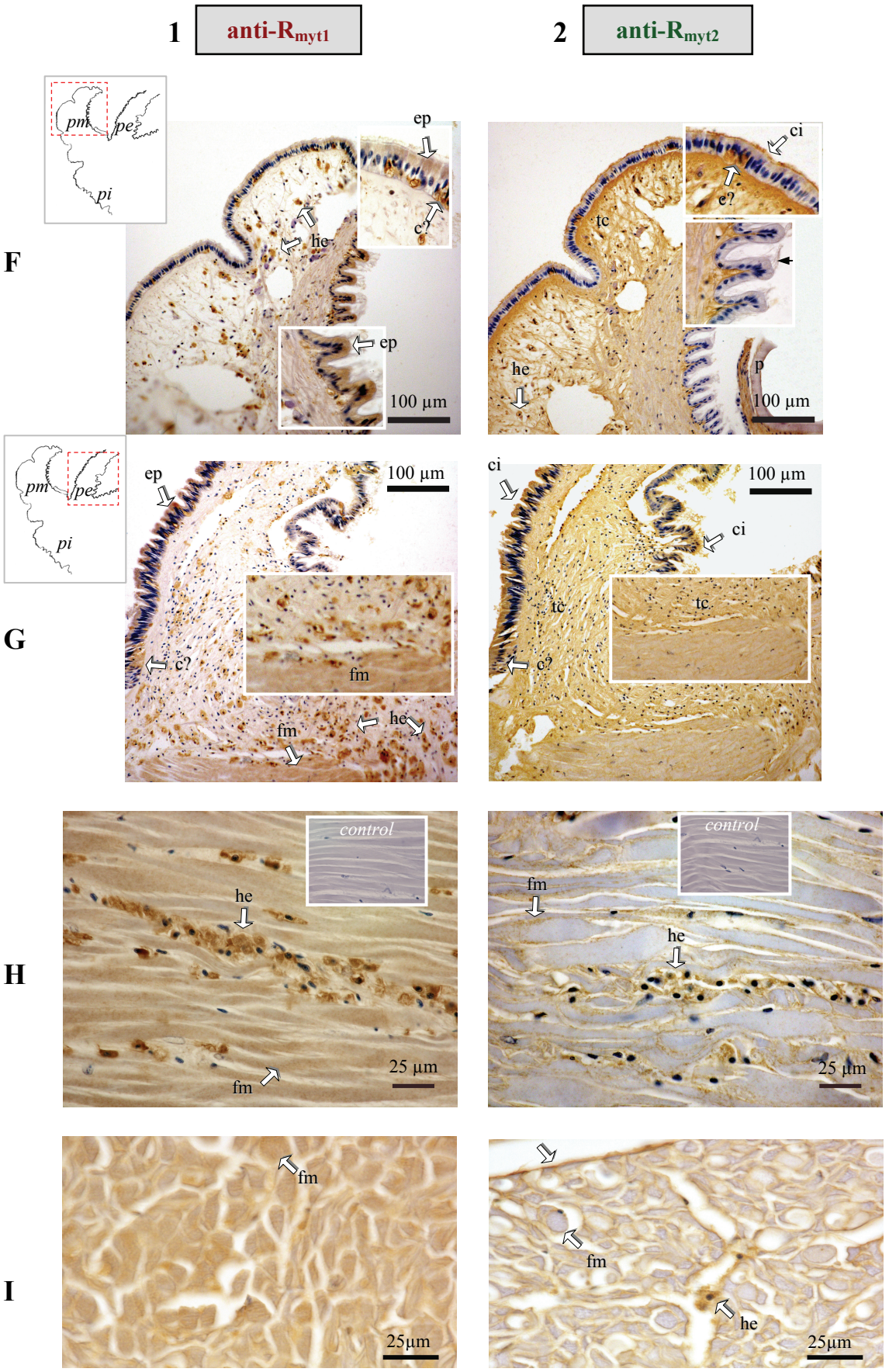
Como se puede observar en la lámina N1, la isoforma R_{myt1} se expresa abundantemente en unas células localizadas en el epitelio cúbico pseudoestratificado y ciliado (ep), más abundantes en

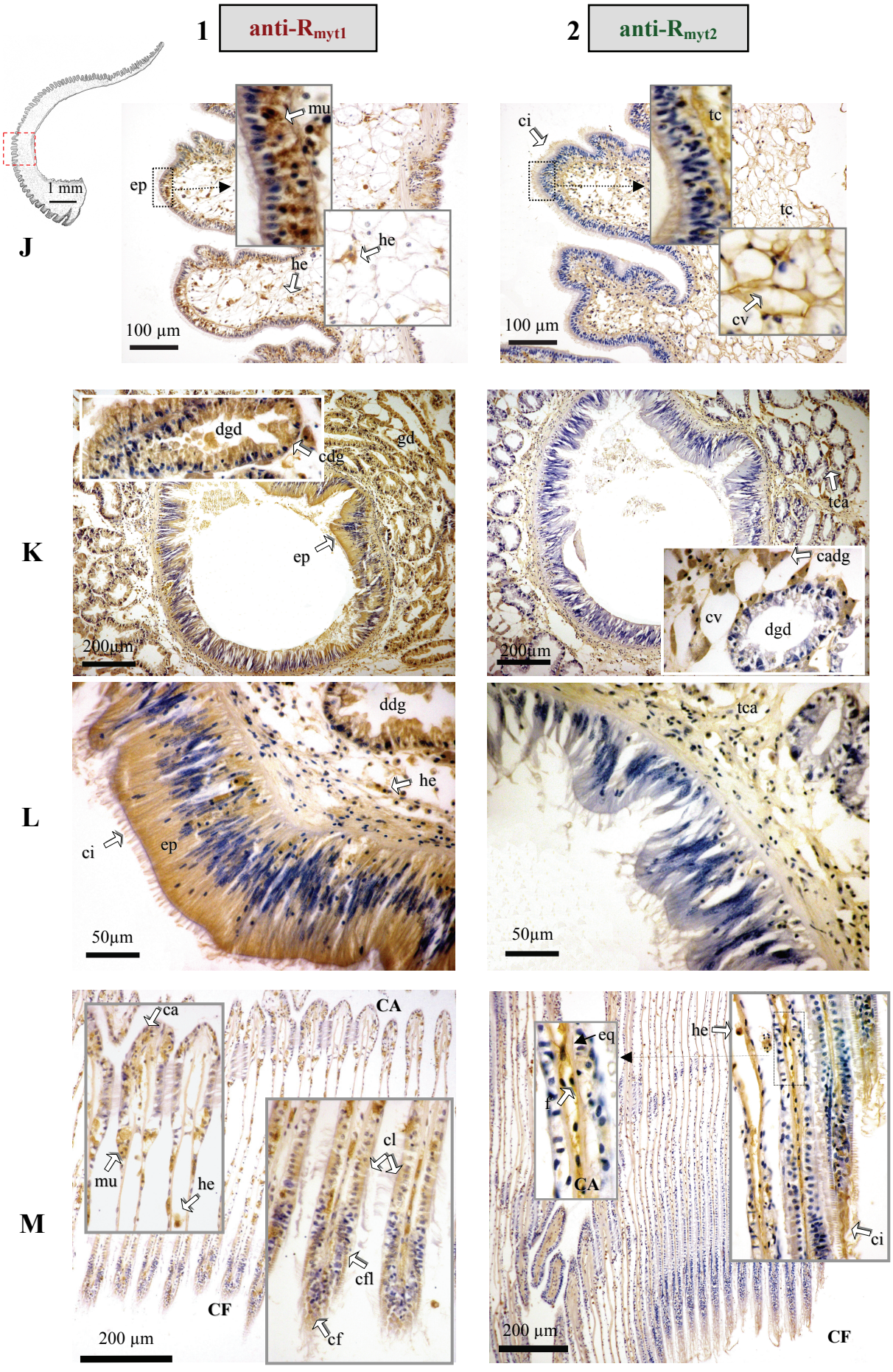
las crestas que en los valles, que podrían ser un tipo de mucocitos (mu). En estas mismas células se puede observar también la presencia de R_{myt2}, aunque en menor cantidad que R_{myt1}, y con una localización perinuclear y en la periferia celular (inserto lámina N2). Destaca también, como ocurre en otros epitelios ciliados, la abundante expresión de R_{myt2} en los cilios (ci).

Debajo del epitelio, se observa la presencia de R_{myt1} en células aisladas situadas en el tejido conjuntivo, que podrían ser hemocitos (he), así como en el interior de las fibras musculares (fm). Complementariamente, la isoforma R_{myt2} se localiza en el tejido conjuntivo subepitelial y de sostén situado entre las fibras musculares (tc).

Las láminas O y P muestran, respectivamente, un corte longitudinal y transversal del pie, donde se observan, al menos, dos tipos diferentes de células secretoras del biso que se señalan con diferentes flechas en las láminas O1 y P1. En una de estas poblaciones celulares (csb1), en las que se aprecian abundantes gránulos de secreción –ver inserto de tinción con hematoxilina-eosina en la lámina P2– se observa abundante expresión de R_{myt1}, distribuida de forma uniforme en todo el citoplasma celular. En la otra población de células secretoras, en cambio, no se detectó ni R_{myt1} ni R_{myt2}.


1
anti-Rmyt1
2
anti-Rmyt2
A
B
C
D
E
25µm
cep
cs
muI
ci
tc
cv
50µm
he
cadg
caf
a
b
c
d
cmep
spz
f


1
anti-Rmyt1
2
anti-Rmyt2
F
G
H
I
pm
pe
pi
ep
he
c?
100 µm
ci
e?
tc
p
fm
control
25 µm
25µm


1
anti-Rmyt1
2
anti-Rmyt2
J
1 mm
ep
mu
he
he
100 µm
ci
tc
tc
cv
100 µm
K
dgd
cdg
gd
ep
200µm
tca
cadg
cv
dgd
200µm
L
ddg
he
ci
ep
50µm
tca
50µm
M
ca
mu
he
CA
cl
cfl
cf
CF
200 µm
eq
he
f
CA
ci
200 µm
CF

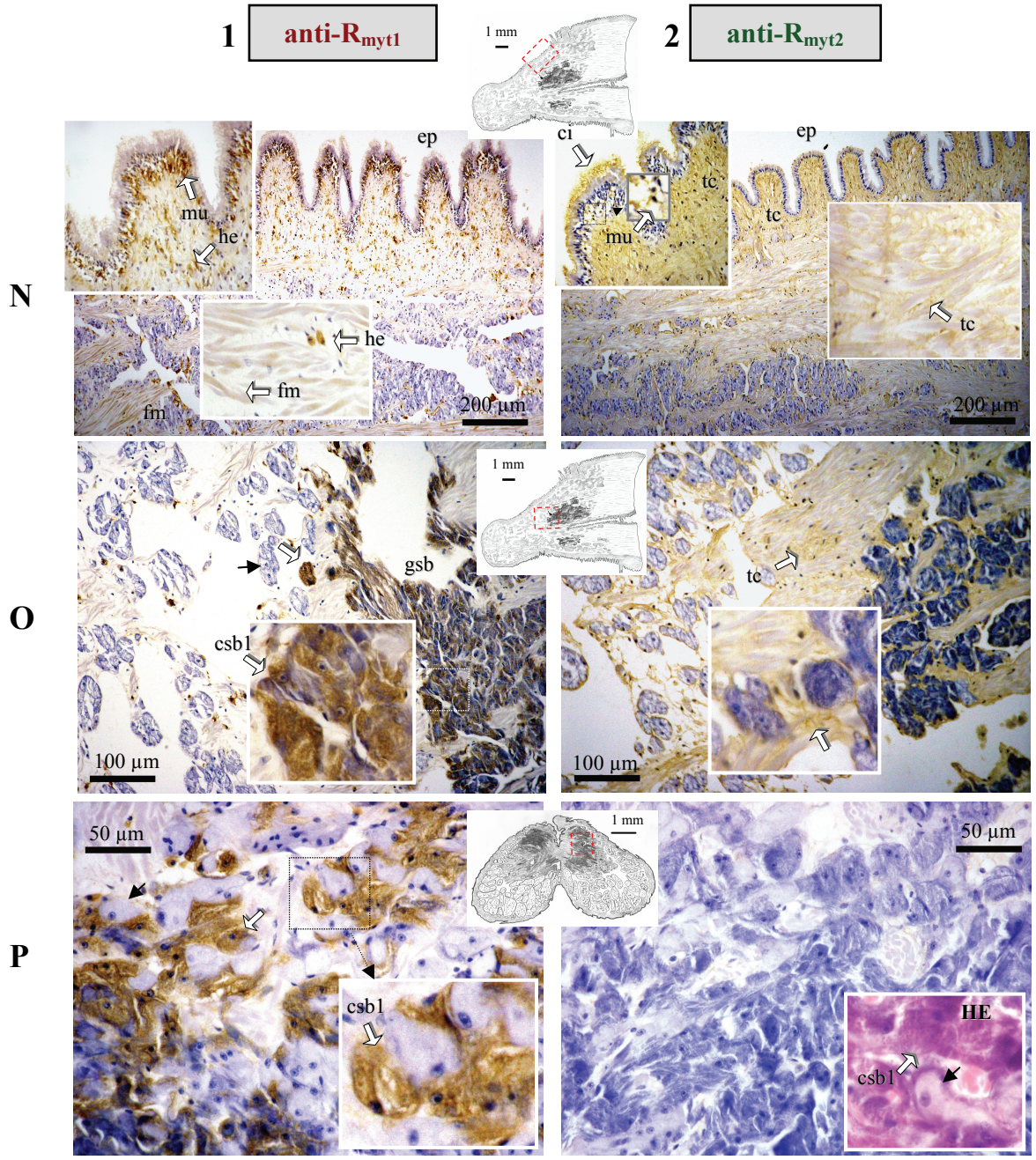


Figura 4.9: Análisis inmunohistoquímico de la distribucion tisular de R_{myt1} y R_{myt2}. **A**: epitelio de glándula genital. **B**: epitelio externo de manto. **C**: gónada ♀. **D**: ovocitos y mórula. **E**: gónada ♂. **F, G**, pliegues del borde del manto. **H**: MARB, corte longitudinal. **I**: MAP, corte transversal. **J**: palpo labial; **K, L**: intestino y glándula digestiva. **M**: branquias. **N-P**: pie y glándula(s) secretora(s) del biso. **Abreviaturas utilizadas**: *ca*, célula afrontal no ciliada; *CA*, cara afrontal; *cadg*, célula adipogranular; *caf*, célula auxiliar del folículo; *cdg*, célula digestiva; *cep*, célula epitelial; *CF*, cara frontal; *cf*, célula ciliada frontal; *cfl*, célula ciliada frontolateral; *cl*, célula ciliada lateral; *ci*, cilio; *cmep*, célula mioepitelial; *cs*, célula secretora; *csb*, célula secretora del biso; *cv*, célula vesicular; *c?* o *?*, célula sin identificar; *dgd*, divertículo glándula digestiva; *ep*, epitelio; *eq*, estructura quitinosa; *f*, flagelo (lámina E) o célula tejido conjuntivo fibroso (lámina M); *fm*, fibra muscular; *gd*, glándula digestiva; *gsb*, glándula secretora del biso; *he*, hemocito; *HE*, tinción hematoxilina; *mu*, mucocito; *mu I*, mucocito tipo I; *p*, periostraco; *spz*, espermatozoide; *tc*, tejido conjuntivo; *tca*, tejido conjuntivo de almacenamiento. En lámina D: *a*: ovocito sin fecundar; *b*, ovocito fecundado; *c*, mórula; *d*, control negativo. En los controles negativos se omitió el primer anticuerpo. En las láminas A y B se señala la lámina basal con una línea discontínua.

4.3.2. DISCUSIÓN

La **distribución de R_{myt1} y R_{myt2}** en las diferentes poblaciones celulares de los tejidos de mejillón **es** claramente **complementaria**. **En algunos tipos celulares se detectó exclusivamente una de las isoformas; en otros se detectaron ambas, pero con una diferente localización dentro de la célula**. Las únicas células donde coexisten ambas isoformas con una localización aparentemente uniforme en todo el citoplasma celular son los hemocitos, aunque la expresión de R_{myt1} es sensiblemente mayor que la de R_{myt2}.

R_{myt1} es la única isoforma presente en algunos epitelios –por ejemplo el epitelio intestinal– en las células que forman los divertículos de la glándula digestiva, en las células auxiliares del folículo gonadal femenino y en un tipo de células secretoras del biso. En cambio, se detectó únicamente R_{myt2} en una población de mucocitos presentes en los epitelios de manto y gónada (muI), en unas células redondeadas sin identificar localizadas en el epitelio externo del manto, en el tejido conjuntivo subepitelial, en las células del tejido conjuntivo de reserva –células vesiculares y adipogranulares– en las células auxiliares que forman la pared del folículo macho y en los flagelos de espermatozoides.

En aquellas poblaciones celulares donde coexisten ambas isoformas, se aprecia, en la mayoría de los casos, una diferente localización celular. Así, **R_{myt1} se distribuye de manera aparentemente uniforme en todo el citoplasma**, mientras que **R_{myt2} se detecta generalmente en la periferia celular o asociada a determinadas estructuras celulares**. Este es el caso, por ejemplo, de las células epiteliales de numerosos tejidos, donde se observa la presencia de R_{myt1} en todo el citoplasma –aunque a veces se aprecia una mayor concentración en la zona apical, véase epitelio gónadal o intestinal- mientras que la presencia de R_{myt2} se restringe al borde apical y a los cilios. Las únicas excepciones entre los tejidos examinados son el epitelio intestinal (láminas K, L) y el epitelio de la superficie externa del pliegue medio del borde del manto (lámina F) en los cuales no se observó expresión de R_{myt2} en las estructuras ciliares. Un similar patrón de expresión se observa en las fibras de músculos «catch» como el MAP o el MARB, con una distribución uniforme de R_{myt1} –la isoforma mayoritaria en estos tejidos– por toda la fibra, y la presencia, escasa, de R_{myt2} en la periferia celular. La localización de R_{myt2} en la zona próxima a la membrana plasmática se observa también en algunas otras poblaciones celulares como ovocitos fecundados o algunos tipos de mucocitos localizados en los epitelios de manto/gónada, palpos labiales o pie.

Esta distribución complementaria de R_{myt1} y R_{myt2} en las diferentes poblaciones celulares de los tejidos –o incluso dentro de una misma célula– **sugiere que**, además de su común capacidad para inhibir la subunidad C en ausencia de AMPc, **cada isoforma posee algunas características funcionales específicas** que determinarían su elección para participar en la regulación de un proceso fisiológico concreto; es decir, **la presencia de dos diferentes isoformas de la misma proteína no parece redundante**. En éste y en otros trabajos previos hemos puesto de manifiesto algunos hechos que demuestran que R_{myt1} y R_{myt2} son funcionalmente diferentes: (*i*) Sólo la isoforma R_{myt2} es fosforilada por la subunidad C (Cao *et al*., 1995a), y este proceso de autofosforilación, en mamíferos, disminuye la afinidad entre ambas subunidades, es decir, hace la holoenzima más sensible a su activación por AMPc (Taylor *et al*., 1990). (*ii*) La PKA_{myt1}, que posee R_{myt1} como subunidad R, es dos veces más sensible a la activación por AMPc que la PKA_{myt2} (ver resultados, apartado 4.4.1.2). (*iii*) La capacidad inhibidora de R_{myt2} es regulada mediante fosforilación por CK2, mientras que R_{myt1} no es fosforilada por esta proteína quinasa (ver resultados, apartado 4.2.1.1; Bardales *et al*. 2007). (*iv*) La presencia de isoformas de subunidad C específicas en MAP y manto (ver resultados, apartado 4.5), donde predomina R_{myt1} y R_{myt2} respectivamente, sugiere que cada isoforma de subunidad R se halla asociada mayoritariamente con una determinado tipo de subunidad C, con características también específicas. (*v*) La presencia de R_{myt2} localizada aparentemente en determinadas zonas celulares –entorno de la membrana plasmática, cilios de los epitelios o flagelos de los espermatozoides– sugiere que esta isoforma podría anclarse a determinadas estructuras celulares mediante su interacción con proteínas de anclaje (AKAPs), al igual que ocurre con la subunidad R tipo II de mamíferos (Turner *et al*., 1998; Brown *et al*., 2003). Sin embargo, nuestros intentos para identificar estas proteínas en extractos de mejillón resultaron, hasta el momento, infructuosos.

Además de estas consideraciones generales, algunos datos obtenidos del análisis inmunohistoquímico resultan, desde nuestro punto de vista, particularmente interesantes, puesto que revelan la presencia de una determinada isoforma de subunidad R en tejidos o células en las cuales se ha demostrado la participación de la PKA como agente regulador de determinados procesos fisiológicos. Por ejemplo, existen numerosos datos acerca del **papel crucial desempeñado por la PKA en la regulación de la motilidad del esperma**, tanto en mamíferos (Vijayaraghavan y Hoskins, 1985; Tash, 1989; Breitbart *et al*., 2006; Burton y McKnight, 2007) como en otros animales: trucha (Morisawa y Okuno, 1982), erizo de mar (Bracho *et al*., 1998) o mejillón (Stephens y Prior, 1992). El efecto de la PKA sobre la motilidad podría ocurrir a través de la fosforilación de la cadena

ligera de la dineína, una proteína que forma parte de la estructura del axonema (Inaba *et al*., 1999). En mamíferos, la PKA tipo II es la única isoforma de PKA presente en los flagelos de los espermatozoides, localizada en la denominada vaina fibrosa del segmento principal del flagelo (Johnson *et al*., 1997; Vijayaraghavan *et al.,* 1997). El anclaje de la PKA a esta estructura tiene lugar a través de la interacción de su subunidad RII con proteínas pertenecientes al grupo de las AKAPs, fundamentalmente con la denominada AKAP4 (Turner *et al.,* 1998; Brown *et al.,* 2003). La importancia fisiológica de esta interacción RII-AKAP4 se ha demostrado recientemente, al comprobar que su interrupción provoca defectos en la movilidad de los espermatozoides (Miki *et al.,* 2002). En el flagelo, la subunidad RII se halla asociada, probablemente, con una isoforma de subunidad C específica de espermatozoides, denominada Cα2 o Cs, que ha sido identificada en mamíferos y también en peces (ver introducción, apartado 1.3.2.1.). La importancia de esta isoforma de subunidad C en la fertilidad se ha demostrado recientemente al comprobar que ratones transgénicos, carentes de Cα2, eran infértiles, a pesar de que podían producir un número normal de espermatozoides (Nolan *et al*., 2004). Este hecho indica que la activación de la PKA no es relevante en el proceso de diferenciación y maduración de los espermatozoides pero sí juega un papel crucial en su motilidad, y por tanto en su capacidad de fertilización. Los datos de nuestro trabajo sugieren que **este papel regulador de la motilidad de los espermatozoides en mejillón es llevado a cabo por la PKA_{myt2},** puesto que únicamente se ha detectado la presencia de la isoforma R_{myt2} asociada a los flagelos, en los folículos machos. Por esta razón consideramos interesante analizar más detalladamente la localización precisa de R_{myt2} en las estructuras del flagelo, e identificar posibles proteínas de anclaje de R_{myt2}; éste será uno de nuestros próximos objetivos. Otro aspecto interesante que parece específico del molusco es que la actividad quinasa de PKA_{myt2} es especialmente sensible a la temperatura, lo que podría explicar la **influencia de la temperatura del agua de mar en el proceso de fecundación**. Este aspecto se tratará con más detalle en el siguiente capítulo (apartado 4.4).

Otro proceso fisiológico regulado por PKA, específico de mejillón, es la denominada **contracción «catch»**, característica de músculos aductores de moluscos bivalvos. Se ha demostrado que la twitchin, una proteína de alto peso molecular, localizada en los filamentos gruesos de estos músculos, es la principal responsable de la contracción pasiva o «catch», al interaccionar con la actina de los filamentos delgados, una vez que los niveles de Ca^{2+} disminuyen y se rompen los puentes cruzados actina-miosina (Siegman *et al*., 1998; Funabara *et al*., 2003; Shelud´ko *et al*., 2004; 2007; Andruchova *et al.,* 2005; Andruchov *et al*., 2006; Butler *et al*., 2006); de esta forma se puede

mantener la contracción durante largos períodos de tiempo, con un gasto mínimo de ATP. Para que tenga lugar la interacción twitchin-actina es necesario que la primera se halle defosforilada (Siegman *et al*., 1997), y en consecuencia, el cese de la contracción «catch» ocurre cuando la twitchin es fosforilada por la PKA (Siegman *et al*., 1998; Funabara *et al*., 2003), en un proceso de señalización iniciado por la liberación de serotonina (Cole y Twarog, 1972). Por tanto, la PKA desempeña un papel crucial en la liberación del «catch». Nuestros datos indican **que probablemente esta función es llevada a cabo por la PKA_{myt1}, puesto que la isoforma R_{myt1} se expresa mayoritariamente en este tejido**, y además se localiza, de manera uniforme, en toda la fibra; en cambio, la presencia de R_{myt2} es escasa y restringida a la periferia celular. Nuestro objetivo futuro es estudiar más detalladamente la localización precisa de R_{myt1} dentro de la fibra muscular, para determinar su posible asociación con proteínas de los filamentos.

Otro resultado que merece ser destacado es la **fuerte expresión de la isoforma R_{myt1} en un tipo de células secretoras del biso** (láminas O y P), lo que **sugiere la participación de la PKA en el proceso de formación de esta estructura**. Como hemos descrito en el apartado 1.4.3.8 la formación del biso es un proceso notablemente complejo, en el que participan diferentes tipos de glándulas localizadas a lo largo del pie, o en la base del mismo (Vitellaro-Zucarello, 1980; 1981; 1983; Waite, 1992). Por tanto –dada la importancia de este proceso desde el punto de vista biotecnológico- consideramos interesante realizar también un estudio en mayor profundidad para identificar con más precisión las células que expresan R_{myt1} y determinar el posible papel de la PKA_{myt1} en la regulación del proceso de síntesis o secreción de las proteínas precursoras de la estructura del biso.

Finalmente, otro resultado que resultó en cierta forma sorprendente para nosotros es la ausencia **tanto de R_{myt1} como de R_{myt2} en los ovocitos dentro del folículo femenino**, que contrasta con la **fuerte expresión de ambas isoformas, especialmente de R_{myt1}, en los ovocitos liberados tras el desove**. En mamíferos se han realizado numerosos estudios que adjudican a la PKA un papel en el control de la maduración de los ovocitos. Un elevado nivel de AMPc y la consecuente activación de la PKA detiene el proceso de meiosis, mediante la inhibición de un factor promotor de la maduración; el descenso en los niveles de AMPc en la preovulación, como consecuencia de la secreción de hormona luteinizante (LH), induce la reanudación de la meiosis y la maduración del ovocito (Dekel, 2005; Burton y McKnight, 2007; Kovo *et al*., 2006). Los resultados del análisis inmunohistoquímico de la gónada de mejillones hembra sugieren que la expresión de la PKA en los ovocitos dentro del folículo gonadal está inhibida, y por tanto no parece que la PKA desempeñe un papel regulador, ralentizando el proceso de maduración, como ocurre en mamíferos. En

cambio, la fuerte expresión observada una vez inducido el desove, que ocurre incluso antes del proceso de fecundación, sugiere que la PKA podría desempeñar un papel en el proceso de fecundación.

4.4. Purificación y caracterización de PKA_{myt1} y PKA_{myt2} – activación por nucleótidos cíclicos

4.4.1. RESULTADOS

4.4.1.1. Purificación parcial de PKA_{myt1} y PKA_{myt2}

Las holoenzimas PKA_{myt1} y PKA_{myt2} –que contienen respectivamente R_{myt1} y R_{myt2} asociada con la subunidad C- se purificaron parcialmente a partir de MAP y de manto de mejillón, respectivamente. En ambos casos se siguió un protocolo similar, basado en una cromatografía de intercambio iónico en una columna Mono Q-FPLC. Dado que habíamos observado que el tejido de MAP contiene una cantidad significativa de PKA_{myt2} junto con la principal isoforma PKA_{myt1}, la muestra procedente de tejido de MAP se pasó, previamente a la cromatografía sobre Mono-Q, a través de una columna de inmunoafinidad, que contenía un anticuerpo anti-R_{myt2} como ligando. Esta estrategia nos permitió eliminar completamente la isoforma PKA_{myt2} de la preparación de PKA_{myt1}.

La figura 4.10, muestra los perfiles de elución de la columna mono-Q de la actividad proteína quinasa, correspondiente al extracto de MAP (cromatograma A) y al extracto de manto (cromatograma B). En el primer caso, se observa un solo pico de actividad proteína quinasa dependiente de AMPc, que eluyó a una concentración de ClNa 0,21 M. El análisis mediante inmunotransferencia de las fracciones correspondientes a este pico reveló la presencia de la subunidad R_{myt1}. El pico secundario de actividad proteína quinasa independiente de AMPc podría corresponder a la elución de subunidad C disociada.

En el cromatograma B se observan dos picos con actividad proteína quinasa dependiente de AMPc, que eluyeron a concentraciones de ClNa 0,23 M y 0,34 M. El análisis de las fracciones mediante inmunotransferencia, utilizando un anticuerpo anti-R_{myt2}, reveló la presencia de una proteína de 54 kDa que se corresponde con la subunidad R_{myt2}. En las fracciones correspondientes al pico secundario, el anticuerpo reconoció dos bandas de baja masa molecular que podrían corresponder a fragmentos proteolíticos de R_{myt2} asociados con subunidad C.

Las fracciones 17-19 del cromatograma A (preparación enzimática PKA_{myt1}) y las fracciones 15-17 del cromatograma B (preparación enzimática PKA_{myt2}) se mezclaron y se dializaron como se describió en Material y métodos. La actividad específica de las preparaciones finales de PKA_{myt1} y PKA_{myt2} fue de 20,0 unidades/mg proteína y 16,8 unidades/mg proteína, respectivamente.

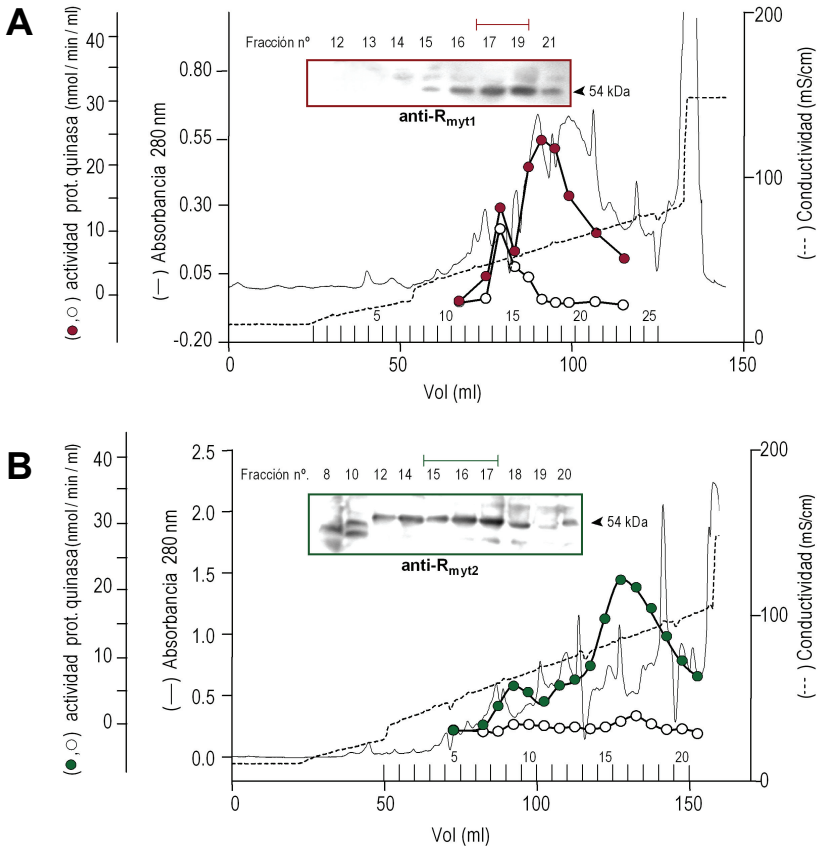


Figura 4.10. Purificación de dos isoformas de PKA a partir de diferentes tejidos de mejillón: perfil de elución de la actividad PKA de la columna Mono-Q-FPLC. Extractos de MAP (cromatograma A) y de tejido de manto (cromatograma B) se pre-purificaron mediante cromatografía de DEAE-celulosa y a continuación se aplicaron a una columna Mono-Q HR 16/10-FPLC. Las proteínas retenidas se eluyeron mediante la aplicación de un gradiente de ClNa. En las fracciones recogidas se midió la actividad proteína quinasa en ausencia (○) y en presencia (●) de AMPc 1 µM. Alícuotas de las fracciones también se analizaron mediante inmunotransferncia con anticuerpos específicos anti-R_{myt1} (A) y anti-R_{myt2} (B) (figuras insertadas).

Para verificar la pureza de ambas preparaciones, sendas alícuotas se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-R_{myt1} y anti-R_{myt2}. Como se muestra en la figura 4.11, no se observó reactividad cruzada, lo que indica que la preparación de PKA_{myt1} no contenía la isoforma PKA_{myt2} y viceversa.

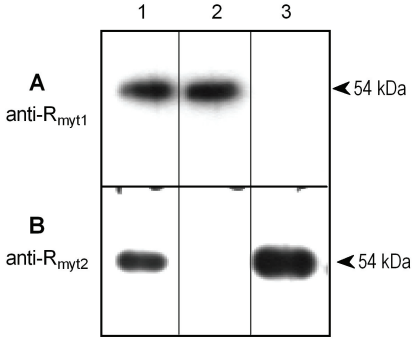


Figura 4.11. Análisis mediante inmunotransferencia de las preparaciones enzimáticas de PKA_{myt1} y PKA_{myt2}.

1. Control: 100 ng de R_{myt1} (A) o Rmyt2 (B).
2. Preparación de PKA_{myt1} (fracciones 17-19), 15 µg proteína
3. Preparación de PKA_{myt2} (fracciones 15-17), 20 µg proteína

Las muestras se congelaron en alícuotas a –20 ºC. En esas condiciones, no se observó pérdida significativa de actividad enzimática ni disociación de las holoenzimas durante un período de, al menos, tres meses.

4.4.1.2. Activación de PKA_{myt1} y PKA_{myt2} por AMPc y GMPc

En primer lugar se analizó la capacidad del AMPc y del GMPc para activar PKA_{myt1} y PKA_{myt2}, utilizando el péptido «kemptide» como sustrato específico de la PKA. Como se puede observar en la figura 4.12, tanto AMPc como GMPc pueden activar completamente las dos isoformas, aunque ambas holoenzimas son muy específicos para el primer nucleótido. El valor de la constante de activación aparente (K_a) (tabla 4.2) indica que PKA_{myt1} y PKA_{myt2} muestran, respectivamente, una sensibilidad 86 veces y 139 veces mayor para AMPc que para GMPc.

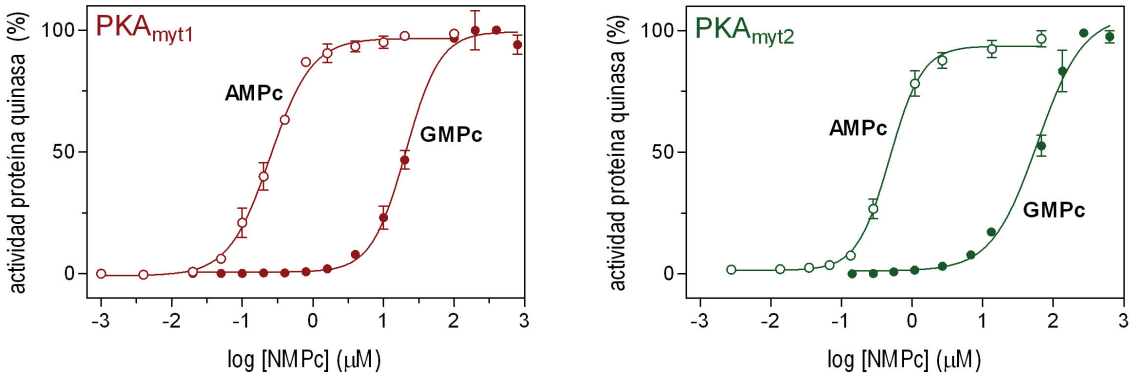


Figura 4.12 Activación de las isoformas de PKA de mejillón por nucleótidos cíclicos. La actividad enzimática se determinó a diferentes concentracines de AMPc o GMPc, a 25 ºC y en condiciones de saturación de sustratos (100 µM «kemptide» y 0.2 mM MgATP). Las actividades se expresan como porcentajes de la máxima activación alcanzada con AMPc. Los datos son la media ± SEM de cuatro experimentos independientes.

Tabla 4.2. Activación de las isoformas de PKA de mejillón por AMPc y GMPc. Valores de la constante de activación aparente (K_a) y del coeficiente de Hill (n_H). La constante de activación aparente para AMPc y GMPc (concentración de nucleótido que da lugar a un 50% de activación máxima) y el coeficiente de Hill, se calcularon a partir de los datos de la Figura 4.12

	K_a (µM)	n_H	K_a (µM)	n_H
PKA_{myt1}	0,245 ± 0,029	1,52 ± 0,20	20,7 ± 1,3	1,69 ± 0,15
PKA_{myt2}	0,509 ± 0,063*	1,86 ± 0,24	70,9 ± 2,9*	1,36 ± 0,21

**Diferencias estadísticamente significativas con respecto a los correspondientes valores de PKA_{myt1} ($p<0.01$)*

Por otra parte, comparando la afinidad de ambas isoformas por los dos nucleótidos se observa que PKA_{myt1} es 2 veces más sensible a la activación por AMPc y 3,5 veces más sensible a la activación por GMPc que PKA_{myt2}.

Finalmente, en todos los casos se observó cooperatividad positiva en la activación de ambas proteína quinasas, con coeficientes de Hill (n_H) que oscilan entre 1,36 y 1,86 (tabla 4.2), lo que indica que existe una cooperatividad positiva en la unión del nucleótido.

4.4.1.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad PKA_{myt1} y PKA_{myt2}

En la figura 4.13 se muestran las curvas de activación por AMPc obtenidas a tres temperaturas diferentes: 10 ºC, 25 ºC y 40 ºC. Los valores de K_a aparente, calculados a partir de los datos obtenidos, indican que la variación de temperatura no afecta significativamente a la afinidad por AMPc de ninguna de las dos isoformas de PKA. Sin embargo, la temperatura modifica claramente la activación máxima alcanzanda (V_{max}), y este efecto fue notablemente superior sobre PKA_{myt2} que sobre PKA_{myt1}. Por ejemplo, cuando la temperatura se incrementó de 10 ºC a 40 ºC, el valor de V_{max} para PKA_{myt1} aumentó en un 50%, mientras que la V_{max} para PKA_{myt2} aumentó 3,5 veces.

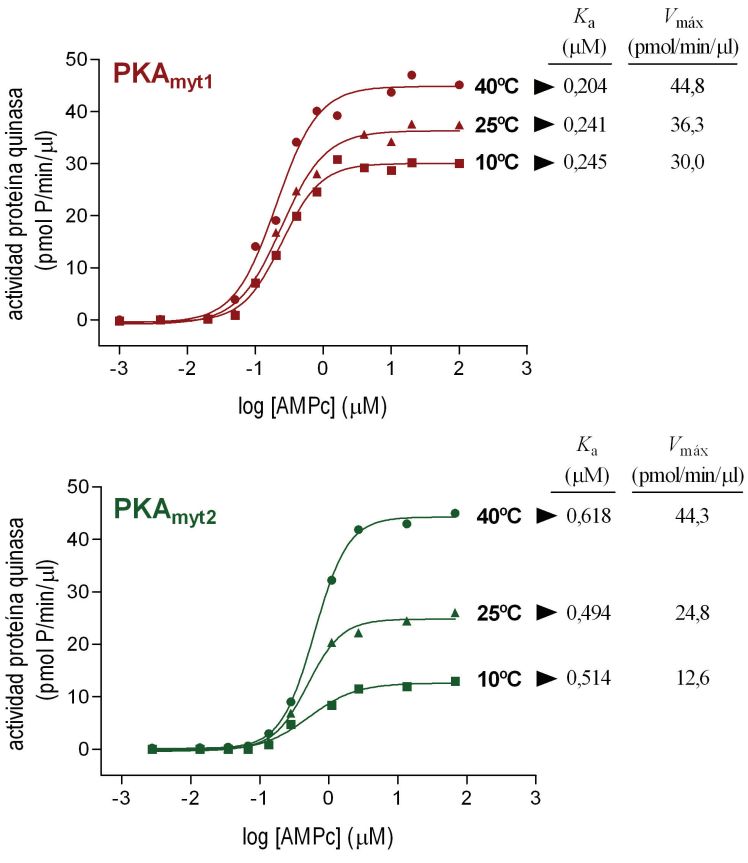


Figura 4.13. Efecto de la temperatura sobre la activación por AMPc de las isoformas de PKA de mejillón. La actividad enzimática se determinó a diferentes concentracines de AMPc, a tres diferentes temperaturas (10 ºC, 25 ºC y 40 ºC) en condiciones de saturación de sustratos (100 μ M «kemptide» y 0.2 mM MgATP).

Con el objetivo de analizar este efecto más detalladamente, se midieron las actividades enzimáticas de ambas isoformas de PKA a intervalos de temperatura de 5 ºC, en un rango entre 5 ºC y 40 ºC, utilizando concentraciones saturantes de sustratos («kemptide» y ATP) y AMPc. Las gráficas de Arrhenius resultantes de los datos obtenidos se muestran en la figura 4.14.

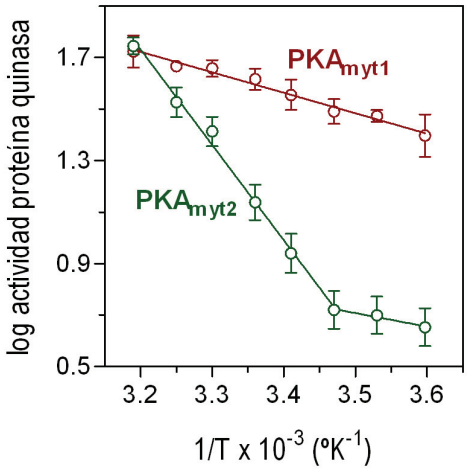


Figura 4.14. Gráficas de Arrhenius obtenidas para las isoformas de PKA de mejillón. Las actividades enzimáticas se determinaron a concentraciones saturantes de sustratos y AMPc (1 µM), a intervalos de temperatura de 5 ºC en un rango entre 5 y 40 ºC. Los datos representados son la media ± SEM de tres determinaciones independientes.

Como se observa, para la isoenzima PKA_{myt1}, la gráfica de Arrhenius fue lineal en todo el rango de temperaturas ensayado, y el valor de la energía de activación (E_a) calculada fue de 15,3 ± 1,5 KJ/mol. Por el contrario, la gráfica correspondiente a la isoforma PKA_{myt2} mostró un punto de ruptura, a una temperatura aproximada de 15 ºC, que origina dos tramos en la recta con diferente pendiente. La E_a para la reacción a temperaturas inferiores a 15 ºC fue de 10,6 ± 6,5 KJ/mol (similar a PKA_{myt1}) mientras que a temperaturas superiores a 15 ºC fue 7 veces más alta (70,9 ± 8,1 KJ/mol; diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor de PKA_{myt1}, p<0,005. En conclusión, a temperaturas superiores a 15 ºC, la actividad proteína quinasa de PKA_{myt2} es notablemente más dependiente de la temperatura que la de PKA_{myt1}.

4.4.2. DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que PKA_{myt1} y PKA_{myt2}, las dos isoformas de PKA identificadas en mejillón muestran un comportamiento similar a sus homólogas de mamíferos en cuanto a su capacidad para ser activadas por nucleótidos cíclicos.

En primer lugar, **PKA_{myt1} es más sensible a la activación por AMPc que PKA_{myt2}**, lo mismo que ocurre con la PKA tipo I *vs* PKA tipo II de mamíferos (Dostmann y Taylor, 1991; Zawadzki y Taylor, 2004). Además, los valores de K_a aparente para AMPc obtenidos para ambas isoformas de PKA de mejillón se encuentran dentro del rango de valores descritos para las isoenzimas de

mamíferos (Dostmann y Taylor, 1991; Zawadzki y Taylor, 2004; Herberg *et al*., 1994; Zorn *et al*., 1995). Esta similitud entre las propiedades de las isoenzimas de mamíferos y las de mejillón en cuanto a su activación por AMPc, concuerda con el alto grado de homología encontrado en las secuencias de las proteínas de ambos orígenes, especialmente en aquellas regiones localizadas en los dominios de unión de AMPc (Díaz-Enrich *et al*., 2003; apartado 4.1 de este trabajo).

En segundo lugar, **aunque tanto el AMPc como el GMPc son capaces de activar completamente a PKA_{myt1} y a PKA_{myt2}, ambas isoenzimas son muy selectivas para el primer nucleótido**. Este comportamiento es también semejante al descrito para la PKA de mamíferos, que muestra una afinidad aproximadamente 100 veces mayor por AMPc que por GMPc (Francis y Corbin, 1999). En cambio, la PKA de levadura (Cytrynska *et al*., 1999) y también la holoenzima procedente de algunos invertebrados tales como insectos (Vardanis, 1980; Mane *et al*., 1985) o el cangrejo del género *Chasmagnathus* (Locatelli *et al*., 2001) poseen afinidades comparables por AMPc y por GMPc, y es probable que puedan ser activadas *in vivo* por cualquiera de los dos nucleótidos.

Algunos datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio sugerían que PKA_{myt1} podría tener una alta afinidad por GMPc, ya que la subunidad R_{myt1} fue identificada mediante marcaje con 8-N_3-[^{32}P]GMPc, y de hecho se purificó inicialmente utilizando una columna de agarosa-GMPc (Rodríguez *et al*., 1998). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, aunque PKA_{myt1} es 3,5 veces más sensible a la activación por GMPc que PKA_{myt2}, el valor de K_a aparente para GMPc (20,7 µM) es aproximadamente 200 veces mayor que el nivel de GMPc en tejido de mejillón (Díaz-Enrich *et al*., 2003); por tanto, **puede descartarse la posibilidad de que la isoforma PKA_{myt1} pueda mediar los efectos del GMPc *in vivo***.

En el presente trabajo también se analizó el efecto de la temperatura sobre la actividad proteína quinasa de ambas isoformas de PKA. En primer lugar, no se observó ninguna diferencia entre PKA_{myt1} y PKA_{myt2}, en cuanto a la influencia de la temperatura sobre la capacidad de unión de AMPc; el valor de K_a aparente para AMPc no se modificó significativamente en ningún caso por cambios de temperatura, lo que sugiere que la temperatura no afecta apreciablemente a la conformación de R_{myt1} y R_{myt2}, al menos en los dominios de unión de AMPc. Sin embargo, la temperatura sí modificó notablemente la actividad proteína quinasa, tanto de PKA_{myt1} como de PKA_{myt2}, determinada a concentraciones saturantes de AMPc, es decir, cuando las holoenzimas se hallan disociadas, lo que sugiere que la temperatura afecta fundamentalmente a la conformación de la subunidad C. Un hecho interesante es la clara diferencia observada entre PKA_{myt1} y PKA_{myt2} en cuanto al efecto de la temperatura sobre la V_{max}; la gráfica de Arrhenius correspondiente a la isoforma PKA_{myt2} mostró un punto de ruptura a una temperatura de 15 ºC y, en consecuencia, en

el rango de temperaturas superiores a ésta, **la actividad de PKA_{myt2} muestra una notablemente mayor dependencia de la temperatura, en comparación con la de PKA_{myt1}.**

Este comportamiento implica que la subunidad C presente en la holoenzima PKA_{myt2} debe sufrir un cambio conformacional a temperaturas superiores a 1 5ºC y sugiere que PKA_{myt1} y PKA_{myt2} poseen también diferentes isoformas de subunidad C.

Un comportamiento similar al de PKA_{myt2} ha sido descrito por otros autores para la PKA de algunos animales hibernantes, como el murciélago *Myotis lucifugus* (Holden y Storey, 1998) y la ardilla *Spermophilus richardsonii* (MacDonald y Storey, 1998). La gráfica de Arrhenius obtenida para la PKA de estos animales, muestra también un punto de ruptura a una temperatura de 10 ºC, pero, al contrario de PKA_{myt2}, el incremento en la energía de activación se produce en el rango de temperaturas más bajas. Estos autores sugieren que el efecto de las bajas temperaturas sobre la actividad de PKA podría contribuir a la depresión metabólica general que tiene lugar en el estado de hibernación, mediante la inhibición de la actividad PKA.

De la misma manera, el diferente efecto de la temperatura sobre la actividad proteína quinasa de ambas isoformas de PKA de mejillón se podría explicar también en función del papel que desempeña cada una de ellas en los tejidos donde se localizan.

Los estudios inmunohistoquímicos llevados a cabo (ver resultados, apartado 4.3) muestran que PKA_{myt1} se asocia principalmente con las miofibrillas de los músculos tipo «catch» del molusco, como por ejemplo el MAP, responsable del cierre de la concha durante los períodos de exposición al aire. El papel de la PKA_{myt1} en estos músculos «catch» de moluscos bivalvos es bien conocido: la activación de la PKA, inducida por la liberación de serotonina, provoca la relajación del estado «catch», a través de la fosforilación de una proteína de alto peso molecular, denominada twitchin, presente en estos músculos (Siegman *et al*., 1997; 1998; Funabara *et al*., 2001). Es lógico pensar que, los cambios en la temperatura ambiental no deben condicionar la regulación del «catch» y, en consecuencia, la idea de que la actividad PKA_{myt1} (la isoforma presente en estos músculos) no esté condicionada por la temperatura parece razonable.

Por su parte, R_{myt2} se detectó, entre otras células, en los flagelos de los espermatozoides, dentro de los folículos del tejido del manto. Esta ubicación sugiere un papel importante para esta isoforma de PKA en la fosforilación de determinadas proteínas que regulan la motilidad del esperma en el mejillón, lo mismo que ocurre en mamíferos (Miki *et al*., 2002; Skalhegg *et al*., 2002; Luconi *et al*., 2004). De esta forma, dado que la actividad PKA_{myt2} varía notablemente con la temperatura, por encima de 15 ºC, **la temperatura del agua de mar podría ser un factor importante en el proceso de fecundación**, una vez que los ovocitos y espermatozoides se liberan

del tejido de manto durante el desove. De hecho, la temperatura ha sido propuesta por varios autores como un factor exógeno importante en el control de gametogénesis y el desove en el género *Mytilus* (Lutz y Kennish, 1992).

4.5. Identificación de diferentes isoformas de subunidad C de la PKA de *Mytilus*

4.5.1. RESULTADOS

4.5.1.1. Separación de diferentes isoformas de subunidad C mediante cromatografía de intercambio catiónico

Con el fin de determinar la posible existencia de diferentes isoformas de subunidad C de la PKA, que puedan hallarse asociadas a R_{myt1} o a R_{myt2}, se purificó la subunidad C a partir de un extracto de MAP o de tejido de manto. La purificación se llevó a cabo uniendo la PKA presente en el extracto, a través de su subunidad R, a una resina de DEAE-celulosa y eluyendo específicamente la subunidad C, disociándola del complejo mediante la adición de AMPc al tampón, como se describió en Material y métodos.

Sendas muestras de las preparaciones enzimáticas obtenidas, que contienen subunidad C como proteína mayoritaria –aunque también se observan algunas proteínas contaminantes, en menor concentración– se sometieron a una cromatografía de intercambio catiónico en una columna Mono-S, acoplada a un equipo FPLC.

La figura 4.15A muestra el cromatograma obtenido a partir de la muestra de MAP. La mayoría de las proteínas contaminantes en la preparación enzimática de MAP no se retienen, y son eluidas en el lavado de la columna. Al aplicar el gradiente de ClNa se separan cuatro picos de absorbancia, tres de los cuales presentan actividad proteína quinasa –picos I, II y III– determinada utilizando el péptido «kemptide» como sustrato específico de PKA. Los tres picos eluyen, respectivamente, a concentraciones 0,13, 0,16 y 0,25 M de ClNa. El análisis de las fracciones correspondientes a los picos I, II y III, mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (figura 4.15B), reveló la presencia de una proteína de aproximadamente 40 kDa –aunque con ligeras diferencias en el peso molecular entre los tres picos– reconocida por una anticuerpo anti-subunidad Cα humana (figura 4.15C). Estos datos indican que los picos I, II y III se corresponden con tres variantes isoenzimáticas de la subunidad C, a las que denominamos c1, c2 y c3, respectivamente. El análisis de la fracción 18, correspondiente al primer pico de absorbancia, sin actividad PKA, reveló la presencia de una proteína <30 kDa (figura 4.15B) no reconocida por el anticuerpo anti-Cα (figura 4.15C), tratándose, probablemente, de una proteína contaminante presente en la preparación enzimática. En las fracciones 21-23 se observa también la presencia de una proteína de alto peso molecular (?), que coeluye de forma sistemática con la isoforma c2 (figura

4.15B), y que tampoco es reconocida por el anticuerpo anti-Cα (figura 4.15C). La identificación de esta proteína centrará nuestro interés en el capítulo 4.6.

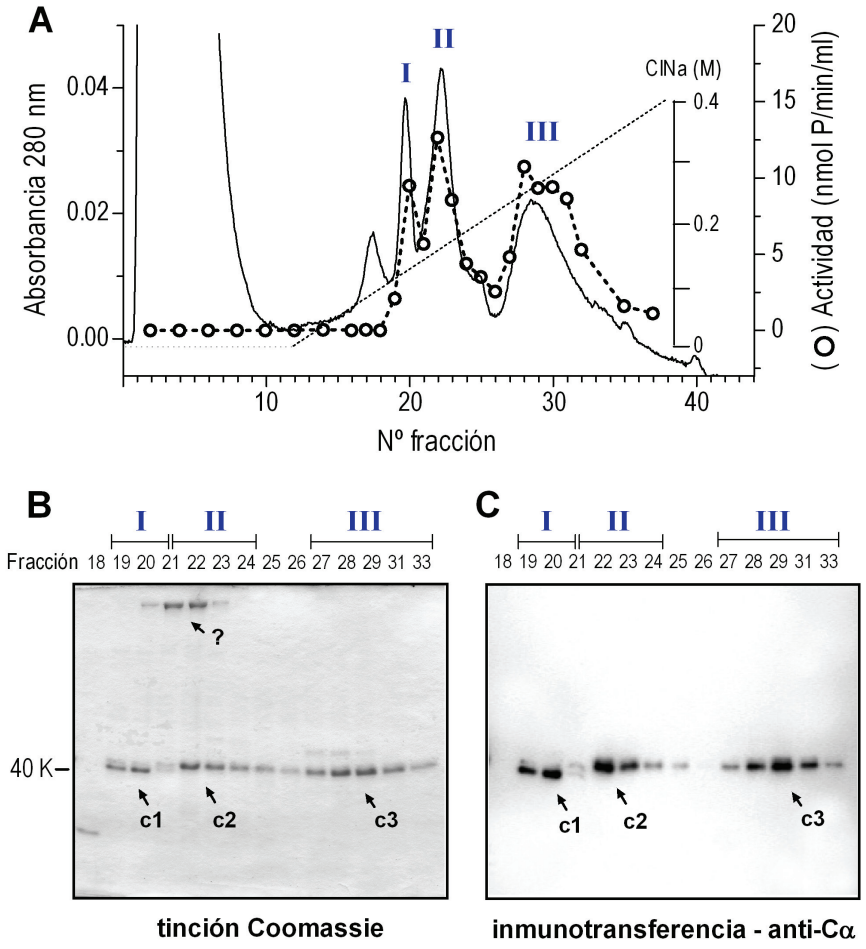


Figura 4.15. Separación de isoformas de subunidad C de MAP mediante cromatografía de intercambio catiónico. (**A**) Cromatograma obtenido al someter una muestra de subunidad C purificada a partir de MAP a una cromatografía en una columna Mono-S–FPLC. Se recogieron fracciones de 1 ml, en las cuales se determinó la actividad proteína quinasa utilizando «kemptide» como sustrato. Alícuotas de las fracciones recogidas se sometieron a SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% que fue teñido con colorante azul de Coomassie (**B**), o analizado mediante inmunotransferenca con un anticuerpo anti-subunidad Cα humana (**C**).

El cromatograma correspondiente a la preparación enzimática obtenida a partir de tejido de manto se muestra en la figura 4.16A. Como se observa, mediante la aplicación del gradiente de ClNa se separaran dos picos de absorbancia, señalados como pico I –mayoritario– y pico II, que eluyen, respectivamente, a concentraciones de sal 0,19 y 0,25 M. Ambos contienen actividad proteína quinasa A, proporcional a los valores de absorbancia. El análisis de las fracciones volumétricas mediante SDS-PAGE mostró que el pico I contiene únicamente una proteína de

aproximadamente 40 kDa, mientras que el pico II contiene dos proteínas de aproximadamente 40 y 42 kDa (figura 4.16B). Las tres bandas son reconocidas por el anticuerpo anti-Cα (figura 4.16.C).

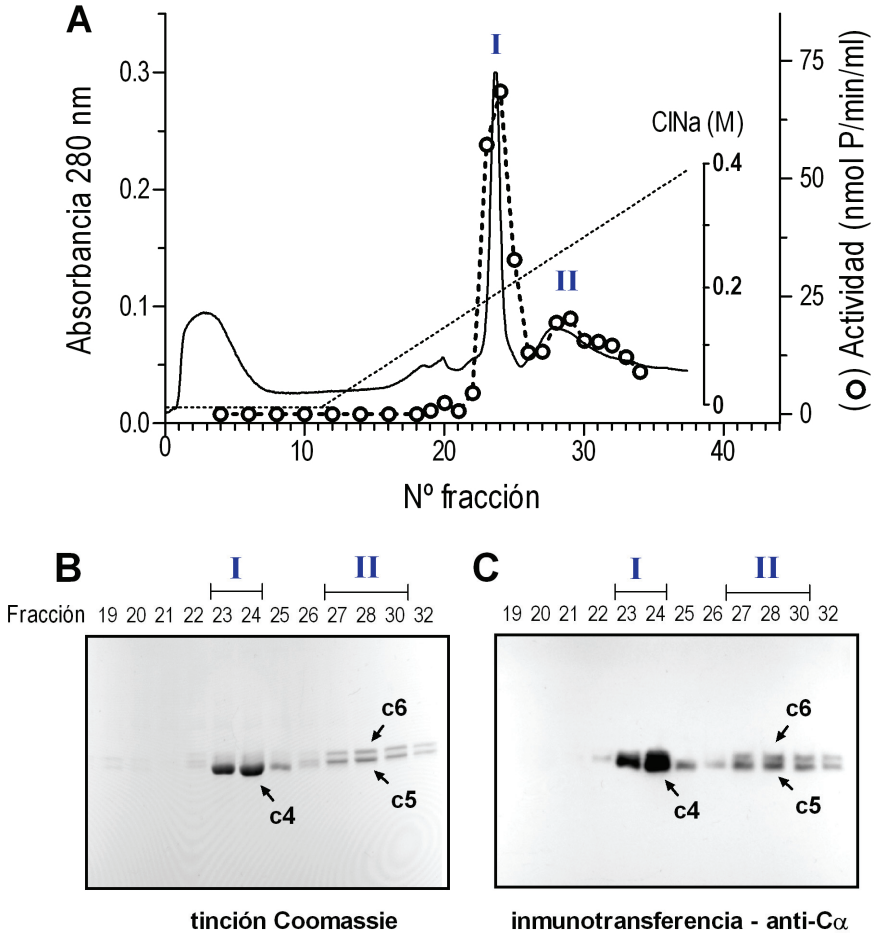


Figura 4.16. Separación de isoformas de subunidad C de manto mediante cromatografía de intercambio catiónico. (**A**) Cromatograma obtenido al someter una muestra de subunidad C purificada a partir de tejido de manto a una cromatografía en una columna Mono-S–FPLC. Se recogieron fracciones de 1 ml, en las cuales se determinó la actividad proteína quinasa utilizando «kemptide» como sustrato. Alícuotas de las fracciones recogidas se sometieron a SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% que fue teñido con colorante azul de Coomassie (**B**), o analizado mediante inmunotransferenca con un anticuerpo anti-subunidad Cα humana (**C**).

En vista de los datos se puede concluir que en tejido de manto existen tres variantes isoenzimáticas de subunidad C, a las que denominamos c4, c5 y c6. La isoforma c4, mayoritaria, se corresponde con el pico I, mientras que las isoformas c5 y c6, aparecen asociadas en el pico II, lo que sugiere que poseen un valor similar de *pI*, aunque se pueden distinguir por su peso molecular.

Alícuotas de las fracciones correspondientes a las seis isoformas c1-c6 se analizaron también mediante inmunotransferencia, con un anticuerpo anti-fosfoserina. Como se muestra en la figura

4.17, todas ellas son reconocidas por este anticuerpo, lo que indica que las isoformas de subunidad C de mejillón son proteínas fosforiladas en serina.

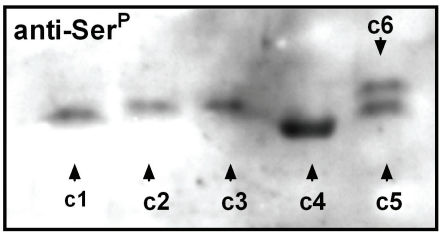


Figura 4.17. Análisis de la presencia de fosfo-serina en las isoformas de subunidad C de mejillón. Muestras (140-300 ng) de proteína de las fracciones 20 (c1), 22 (c2) y 29 (c3) del cromatograma de la figura 4.15A y de las fracciones 24 (c4) y 28 (c5 + c6) del cromatograma de la figura 4.16A se analizaron mediante inmunotransferncia con una anticuerpo anti-fosfoserina.

Este resultado descarta, por tanto, la posibilidad de que algunas de las isoformas se correspondan con la forma fosforilada y defosforilada de la misma proteína.

4.5.1.2.. Determinación del peso molecular de las isoformas de subunidad C

Con el fin de determinar con mayor precisión el peso molecular de las isoformas de subunidad C separadas a partir de MAP y de manto (c1-c6), muestras con cantidades equivalentes de proteína (aproximadamente 1 μg), se analizaron mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% de 15x15 cm. Como control, se utilizó, además del kit de proteínas marcadores de peso molecular, una muestra de subunidad C bovina purificada, cuyo peso molecular, determinado mediante espectrometría de masas, es exactamente 40.980 Da (Herberg *et al*., 1993). Los resultados del análisis se muestran en la figura 4.18.

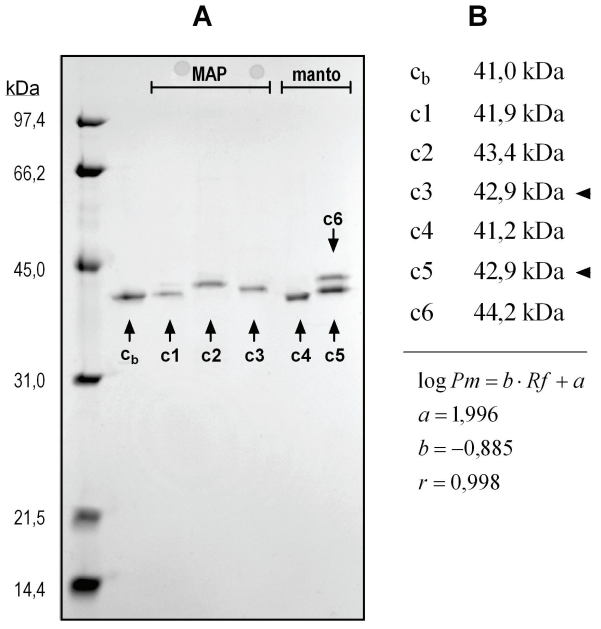


Figura 4.18. Determinación del peso molecular de las isoformas de subunidad C de mejillón. (**A**) Muestras (1-2 μg de proteína) de las fracciones 20 (c1), 22 (c2) y 29 (c3) del cromatograma de la figura 4.15A y de las fracciones 24 (c4) y 28 (c5 + c6) del cromatograma de la figura 4.16A se analizaron mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% de 15x15 cm. (**B**) El peso molecular de cada isoforma se estimó a partir de la ecuación de la recta patrón obtenida con las proteínas de peso molecular conocido (calle 1). C_b, subunidad C bovina (mezcla de cα y Cβ). Las puntas de flecha en la figura B señalan isoformas con el mismo peso molecular aparente.

Como se puede observar existen pequeñas, pero significativas diferencias en la migración de las diferentes isoformas, excepto entre c3 y c5. Los valores de peso molecular, determinados a partir de la ecuación de la recta obtenida al representar *log Pm* frente a *Rf* de los marcadores, se muestran en la figura 4.18B. Como se observa, todas las isoformas de mejillón son ligeramente mayores que la subunidad C bovina. Sus pesos moleculares oscilan entre 41,2 kDa de c4 y 44,2 kDa de c6. Por otra parte c3 (MAP) y c5 (manto) poseen el mismo peso molecular, lo que sugiere que podría tratarse de la misma isoforma presente en los dos tejidos.

4.5.1.3. Caracterización estructural de las isoformas de subunidad C mediante espectrometría de masas (MS)

Para determinar las posibles diferencias estructurales, muestras de las seis isoformas de subunidad C de mejillón se sometieron a una digestión tríptica «en gel», y las mezclas peptídicas obtenidas se analizaron mediante MALDI-TOF MS. Una muestra de subunidad C bovina purificada –correspondiente al denominado pico C_B de una cromatografía de intercambió catiónico (Jedrzejewski *et al*., 1998)– fue también analizada de forma comparativa. Los espectros de masas peptídicas (PMF) obtenidos, correspondientes a las isoformas c1-c6, se muestran en la figura 4.19. El análisis detallado de los mismos permite extraer las siguientes conclusiones: (*i*) la mayoría de las masas peptídicas generadas son comunes a todas las isoformas; (*ii*) en las isoformas c1, c2, c4 y c6 existe, al menos, una masa peptídica única, que se señala con un asterisco en el correspondiente espectro; (*iii*) existe, al menos un péptido, de masa 1059,5 Da –señalado con una punta de flecha azul- compartido solamente por las isoformas c1 y c4, que no se genera a partir del resto de isoformas; (*iv*) complementariamente, existe al menos una masa peptídica de 1605,8 Da –señalada con una punta de flecha naranja– que se genera a partir de las isoformas c2, c3, c5 y c6, pero que está ausente en las muestras c1 y c4; el péptido correspondiente a esta masa fue parcialmente secuenciado a partir de la isoforma c2, como se mostrará más adelante; (*v*) el análisis detallado de los espectros correspondientes a c3 y c5 no muestra ninguna diferencia apreciable, lo que indica que probablemente se trata de la misma isoforma presente tanto en tejido de MAP como de manto.

Por otra parte, la comparación de los espectros PMF de las isoformas de subunidad C de mejillón con el correspondiente a la subunidad C bovina, muestra ocho masas peptídicas compartidas. Los valores de estas masas, así como las secuencias correspondientes a las mismas en la subunidad Cα bovina, deducidas a partir de la digestión tríptica teórica de la proteína, se señalan en el espectro correspondiente a c1, que se muestra en la figura 4.20. Dos de estos

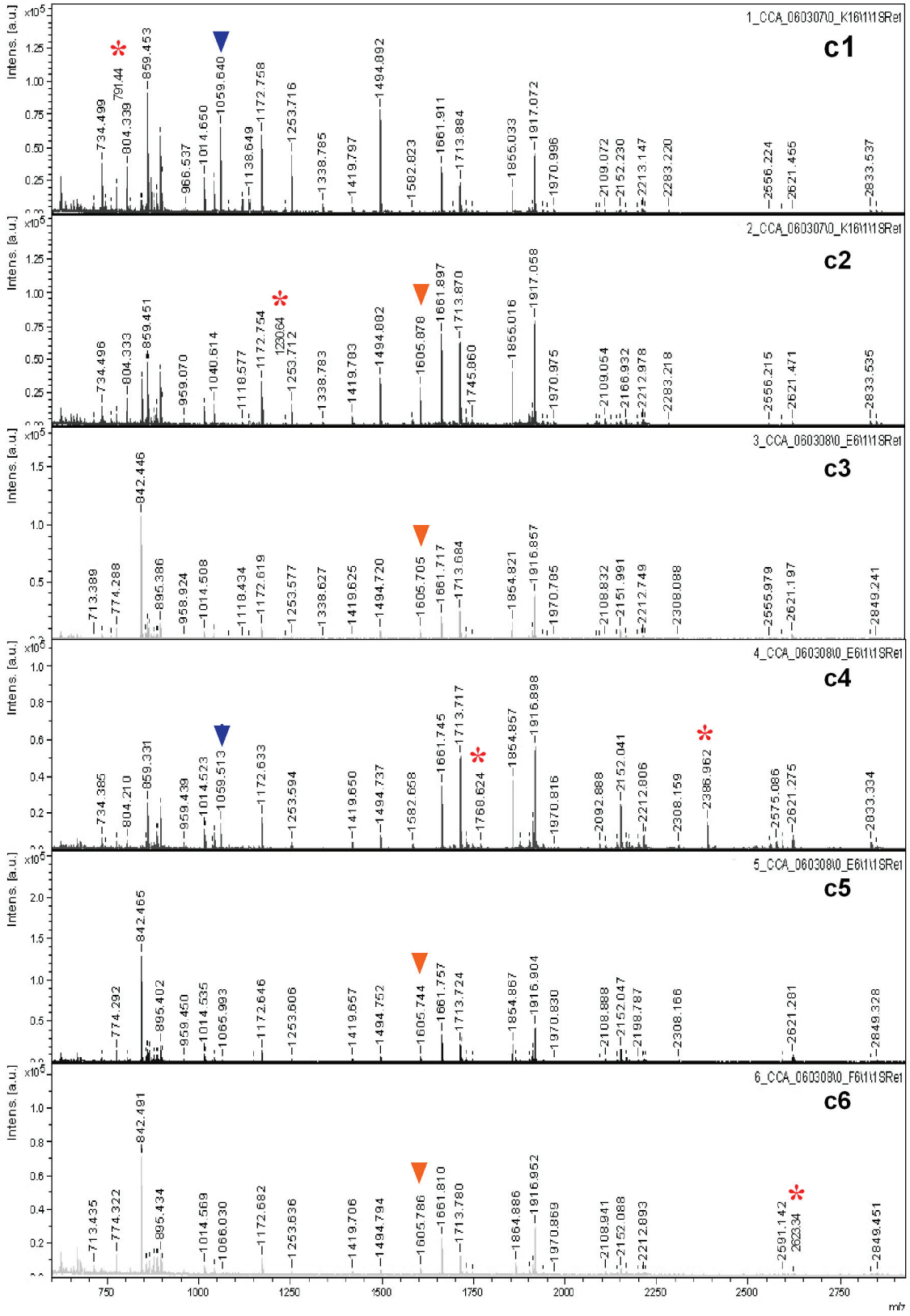


Figura 4.19. Espectros de masas correspondientes a las isoformas de subunidad C de mejillón. Muestras de las isoformas c1-c6 se sometieron a una digestión tríptica «en gel», y la mezclas de péptidos obtenidas se analizaron mediante MALDI-TOF-MS. Los asteriscos indican péptidos únicos para cada isoforma. Las puntas de flecha de color azul señalan péptidos compartidos sólo por las isoformas c1 y c4, y las de color naranja indican péptidos comunes a c2, c3, c5 y c6.

péptidos –marcados con asterisco– con masas de 744,5 y 895,5 fueron también secuenciados a partir de las isoformas c3 y c5 de mejillón (ver tabla 4.3).

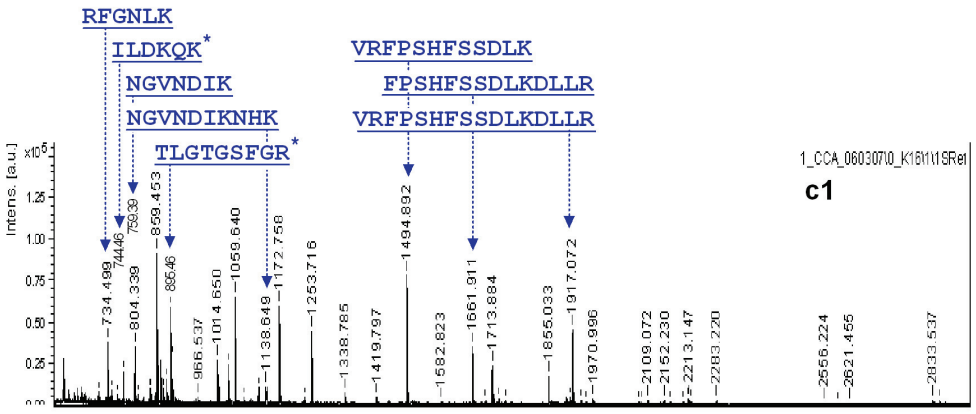


Figura 4.20. Espectro de masas de la isoforma c1 donde se muestran las masas compartidas por todas las isoformas de subunidad C de mejillón y la subunidad Cα bovina. Para cada masa peptídica se muestra la secuencia aminoacídica deducida de la digestión tríptica teórica de Cα. Las secuencias señaladas con asterisco, fueron obtenidas, además, a partir de las isoformas c3 y c5 mediante MALDI-TOF/TOF MS (ver tabla 4.3).

Con el fin de obtener más información sobre las posibles diferencias estructurales, se secuenciaron, mediante MALDI-TOF/TOF MS, algunos péptidos procedentes de algunas de las isoformas, que se muestran en la tabla 4.3. Dos de estos péptidos, con secuencias ILDKQK y TLGTGSFGR, poseen valores de $[M+H]^+$ presentes en los espectros de c1-c6, y también en el correspondiente a C bovina; de acuerdo con estos datos, estas dos secuencias parciales pueden localizarse en la secuencia global de Cα y Cβ1 de mamíferos, y en la correspondiente a la subunidad C de otros organismos como *Lymnaea* (UniProt Q4JIV3), *Aplysia* (UniProt Q16958) o *Caenorhabditis* (UniProtP21137). Las secuencias de otros diez péptidos (3-12 en la tabla 4.3) poseen valores de $[M+H]^+$ detectadas en los espectros de las isoformas c1-c6, pero están ausentes en el espectro de C bovina. Este hecho indica que estas secuencias son compartidas por las seis isoformas de mejillón pero no por Cα. Finalmente, se obtuvo una secuencia incompleta, a partir de la isoforma c2 (secuencia nº 13), que se corresponde con la masa $[M+H]^+$ 1605,8; como se puede observar en los espectros de la figura 4.19, esta masa es compartida por las isoformas c2, c3, c5 y c6, pero está ausente en c1 y c4.

En la figura 4.21A se muestra el alineamiento de las secuencias 1-12 con las regiones homólogas de la isoforma Cα bovina (UniProt P00517), resaltando en color gris los aminoácidos idénticos. Además, se muestran enmarcadas aquellas secuencias de Cα correspondientes a las masas peptídicas presentes tanto en Cα como en c1-c6, señaladas en la figura 4.20; con mucha

Tabla 4.3. Secuencias aminoacídicas obtenidas a partir de las isoformas de subunidad C de mejillón mediante MALDI-TOF/TOF MS.

Nº	SECUENCIA	OBTENIDA DE	*m/z* (Da)	PRESENTE EN
1	**[I/L][1][I/L]DKQK**	c3	744.46	Cα, Cβ1, c1-c6
2	**T[I/L]GTGSFGR**	c3, c5	895.46	Cα, Cβ1, c1-c6
3	**FSEPHSR**	c5	859.40	c1-c6
4	**VF[I/L]VQHK**	c6	870.51	c1-c6
5	**VTDFGFAK**	c3	884.45	c1-c6
6	**KVDAPF[I/L]PK**	c3	1014.59	c1-c6
7	**S[I/L][I/L]QVD[I/L]TK**	c3	1016.59	c1-c6
8	**VTDFGFAKR**	c5	1040.55	c1-c6
9	**S[I/L][I/L]QVD[I/L]TKR**	c5	1172.70	c1-c6
10	**[I/L]KQVEHT[I/L]NEK**	c2	1338.73	c1-c6
11	**[I/L]KQVEHT[I/L]NEKR**	c5	1494.83	c1-c6
12	**GPGDASNFDDYEEEP[I/L]R**	c5	1910.80	c1-c6
13	**KGDVPMNVKE(xxxx)K**[2]	c2	1605,78	c2, c3, c5 y c6

[1] *Leu e Ile son indistinguibles por su masa*
[2] xxxx, *secuencia indeterminada (360.3 Da)*



Figura 4.21. A, alineamiento de los péptidos 1-12 obtenidos de c1-c6 con regiones homólogas de la subunidad Cα bovina. **B,** alineamiento del péptido 13 con una secuencia homóloga en la región N-terminal de la subunidad C (isoforma N1) de *Aplysia*. Los aminoácidos idénticos se muestran sombreados en gris. Las secuencias correspondientes a las masas comunes entre c1-c6 y Cα bovina se muestran en rectángulos vacíos de color gris. Los asteriscos señalan elementos estructurales importantes en la función catalítica (ver texto).

probabilidad estas secuencias formarán parte también de la secuencia global de todas las isoformas del molusco. El porcentaje global de aminoácidos idénticos entre las secuencias 1-12, compartidas por c1-c6, y Cα, es del 89,5%, lo que indica que, en general, la subunidad C es una proteína muy conservada en la evolución.

Por otra parte, el análisis comparativo presentado en la figura 4.21A también permite deducir que las seis isoformas de *Mytilus*, conservan algunos residuos clave en la función enzimática (ver introducción, apartado 1.3.2.3). Estos elementos estructurales, que se señalan con un asterisco en la figura 4.21A, son los siguientes: (*a*) el denominado bucle rico en glicinas (GxGxxG) –residuos 50-55 en Cα– fundamental en la unión del ATP al centro activo; (*b*) Lys^{72} que interacciona directamente con los fosfatos β y γ del ATP; (*c*) His^{87}, que, en la conformación activa de la enzima, interacciona con la fosfo-Thr^{197}, del bucle de activación; (*d*) Glu^{91}, fundamental para posicionar correctamente la Lys^{72}, y (*e*) Asp^{184}, que forma parte del denominado motivo DGF o bucle posicionador del magnesio.

A diferencia de los péptidos 1-12, el péptido 13, no posee ninguna región significativamente homóloga en Cα bovina, pero sí empareja con una región próxima al extremo N-terminal de una isoforma de subunidad C del molusco *Aplysia*, codificada por el denominado exón N1 (Beushausen *et al*., 1988; 1992) (figura 4.21B). Este péptido está ausente en las isoformas c1 y c4, lo que indica que estas dos isoformas difieren de las 4 restantes en la región N-terminal.

4.5.1.4. Caracterización cinética de las isoformas de subunidad C

Con el fin de investigar posibles diferencias en la capacidad catalítica entre las isoformas de subunidad C de mejillón, se realizaron estudios para determinar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} para el sustrato «kemptide», así como el valor de I_{50} para el péptido inhibidor PKI_{5-24}. Como muestras de enzima se utilizaron alícuotas, adecuadamente diluidas, de las fracciones 19 (isoforma c1), 23 (isoforma c2) y 28 (isoforma c3) del cromatograma de la figura 4.15A, y de las fracciones 24 (isoforma c4) y 28 (isoformas c5+c6) del cromatograma de la figura 4.16A. Es necesario recordar que, las isoformas c5 y c6 coeluyen en la cromatografía de Mono-S, y tampoco se pueden separar efectivamente mediante cromatografía de gel filtración, por la pequeña diferencia en sus pesos moleculares.

Los valores obtenidos para los parámetros cinéticos antes indicados se muestran en la tabla 4.4. Como se puede observar, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas ni en los valores de K_m y V_{max} para «kemptide», ni en los valores de I_{50} para PKI_{5-24}, entre las diferentes isoformas de subunidad C de mejillón.

Tabla 4.4. Parámetros cinéticos de las isoformas de subunidad C de mejillón.

	«kemptide»		PKI_{5-24}
isoforma	K_m[1] *(μM)*	$V_{máx}$ *nmol P/min/μg*	I_{50} *μM*
c1	15,8 ± 8,0	6,6 ± 1,9	8,9 ± 1,7
c2	24,7 ± 10,5	4,9 ± 2,2	7,8 ± 1,3
c3	14,7 ± 5,3	4,3 ± 1,3	9,5 ± 2,1
c4	18,6 ± 2,4	3,6 ± 0,5	6,9 ± 2,9
c5+c6	10,5± 5,2	4,0 ± 1,3	7,2 ± 2,7

[1]*Los valores de K_m aparente para el péptido sustrtao «kemptide» y de $V_{máx}$ se determinaron a una concentración de ATP saturante 0,2 mM. Los valores de I_{50} para el péptido inhibidor PKI_{5-24} se determinaron a concentraciones de «kemptide» y ATP 100 μM y 0.2 mM respectivamente. Los datos son la media ± SEM de tres determinaciones.*

Por otra parte, también se analizó la capacidad de las diferentes isoformas de subunidad C para fosforilar *in vitro* proteínas presentes en un extracto del tejido a partir del cual fueron purificadas, es decir, extracto de MAP para las isoformas c1-c3 y extracto de manto para las isoformas c4-c6. Para ello, alícuotas de ambos extractos, obtenidos como se describió en el apartado Material y métodos, se incubaron con las correspondientes isoformas de subunidad C y [γ-^{32}P]ATP, en presencia y ausencia del péptido PKI_{5-24}, inhibidor específico de la subunidad C.

Como se observa en la figura 4.22, tampoco se observaron grandes diferencias en el patrón de proteínas fosforiladas, aunque en el caso del tejido de manto (A) el análisis densitométrico de las autoradiografías, muestra dos proteínas, una de alto peso molecular y otra de peso molecular intermedio –señaladas con un asterisco– que parecen ser fosforiladas solamente por c4, pero no por la mezcla c5+c6.

En el extracto de MAP (B), el patrón de proteínas fosforiladas por c1, c2 y c3 fue aparentemente idéntico. Como se observa, las tres isoformas fosforilan mayoritariamente tres proteínas, señaladas con una flecha. Una de ellas, de alto peso molecular, se identificó por su peso molecular como la proteína twitchin, presente en músculos «catch», y cuya fosforilación por PKA ha sido ampliamente demostrada previamente (Siegman *et al*., 1998; Funabara *et al*., 2003; Béjar y Villamarín, 2006). La segunda fue identificada como actina, en base a su peso molecular y a su espectro PMF obtenido mediante MALDI-TOF MS, ya que la secuencia de la actina de mejillón es conocida (UniProt Q9Y0D6), y por tanto, la identificación mediante la huella de masas peptídicas es posible. La tercera proteína, de bajo peso molecular, señalada con «?», no fue identificada, dado

que, aunque se obtuvo la secuencia de un péptido procedente de la misma –RESEFQSGDLWEVR– no se encontró una homología clara que permitiera su identificación.

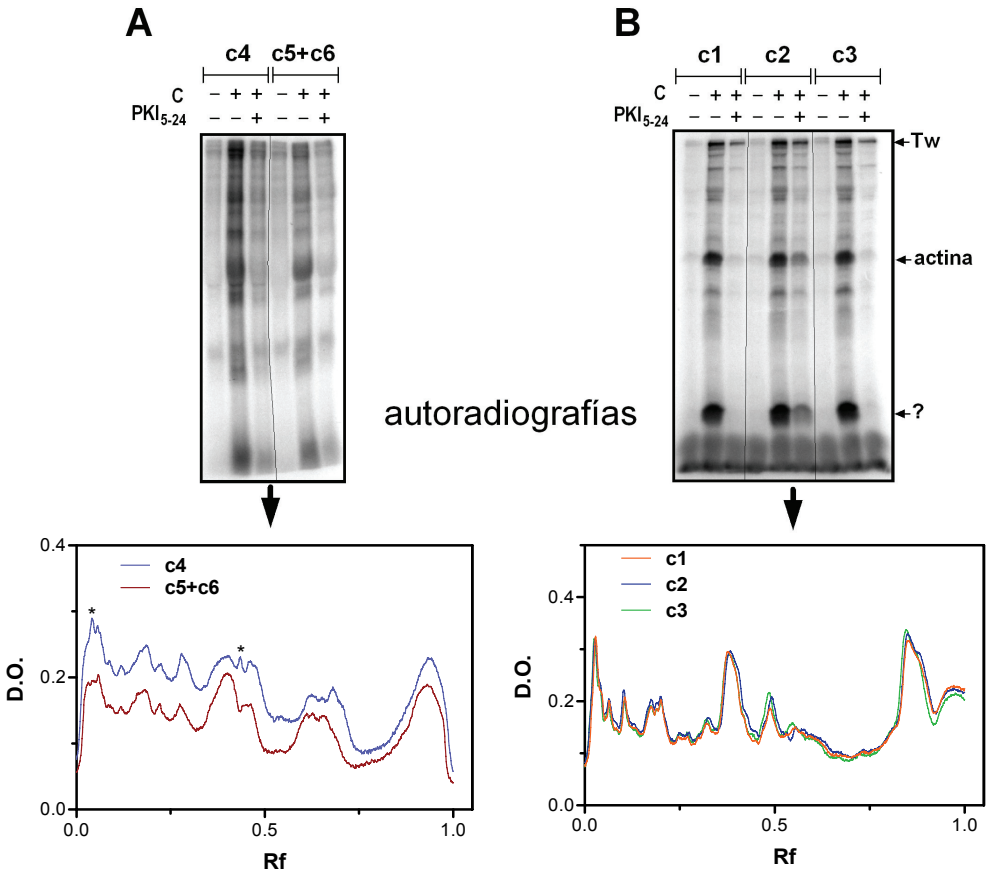


Figura 4.22. Fosforilación *in vitro* de proteínas de extractos de manto (A) y MAP (B) por las isoformas de subunidad C presentes en cada tejido. Muestras de extractos de manto (120 µg de proteína) y MAP (100 µg de proteína) se incubaron a temperatura ambiente con subunidad C (0,005 unidades/µg de proteína; extracto de manto: isoformas c4 y mezcla c5+c6; extracto de MAP: isoformas c1, c2 y c3), Cl_2Mg 5 mM y [γ-^{32}P]ATP 0,2 mM (~500 cpm/pmol) en presencia y ausencia del péptido inhibidor PKI_{5-24} 0,25 µM. Transcurridos 20 min, se pararon las reacciones y se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE y autoradiografía. En autoradiografía B: Tw, twitchin; ?, proteína sin identificar. En la parte inferior se muestran los gráficos correspondientes al análisis densitométrico de las autoradiografías. El asterisco en el gráfico A indica proteína fosforiladas sólo por c4.

4.5.2. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos identificado y separado, mediante cromatografía de intercambio catiónico, varias isoformas de subunidad C de la PKA de mejillón. Las isoformas denominadas c1, c2 y c3 se aislaron a partir de tejido de MAP, mientras que las llamadas c4, c5 y c6 se aislaron a partir de tejido de manto. Los parámetros físico-químicos (*pI*, peso molecular) y los datos estructurales indican que c3 y c5 son la misma isoforma presente en los dos tejidos; por tanto, se puede concluir que **en mejillón existen, al menos, cinco variantes isoenzimáticas de subunidad C**, de las cuales cuatro –c1, c2, c4 y c6– parecen ser **específicas de tejido**, mientras que la otra (c3/c5) existe, al menos, en los dos tejidos estudiados.

Las cinco isoformas son ligeramente diferentes en cuanto a su peso molecular, y todas, excepto c3/c5 y c6 poseen diferentes valores de *pI*, lo que permite su separación en una columna cromatográfica de intercambio catiónico. En cuanto a su abundancia relativa, los datos indican que, en tejido de manto, c4 es la isoforma mayoritaria, siendo su concentración entre 4-5 veces mayor que la suma de c5 y c6; en MAP, los niveles de la isoforma c2 y de la isoforma c3 son similares y superiores a los de c1, la isoforma minoritaria en este tejido.

En principio, las variantes isoenzimáticas de subunidad C podrían generarse por: (*a*) la expresión de genes diferentes; (*b*) corte y empalme alternativo de diferentes exones, a partir de un único tránscrito primario, y (*c*) modificaciones post-traduccionales.

A diferencia de los mamíferos, donde se ha demostrado la existencia de dos genes comunes a todas las especies, que codifican las isoformas Cα y Cβ (Uhler *et al*., 1986a; 1986b; Showers y Maurer, 1986; Adavani *et al*., 1987; Maldonado y Hanks, 1988; Wiemann *et al*., 1991; 1992), en diferentes especies de invertebrados se ha identificado un único gen de subunidad C. Este es el caso del molusco *Aplysia* (Beushausen *et al*., 1992), *Drosophila* (Kalderon and Rubin, 1988), la garrapata *Amblyomma americanum* (Palmer *et al*., 1999) o el nematodo *Caenorhabditis elegans*, (Gross *et al*., 1990), aunque en este último se ha identificado un segundo gen (*F47F2.1b*) que podría codificar una proteína similar a la subunidad C (Tabish *et al*., 1999).

Los datos obtenidos por nosotros indican que, **probablemente, las subunidades C identificadas en mejillón proceden también de un único gen, y se generan por corte y empalme alternativo de diferentes exones a partir de un único tránscrito primario**. Esta conclusión se basa en las siguientes observaciones. En primer lugar, los datos del análisis estructural indican que la mayoría de las péptidos generados por digestión tríptica son comunes a todas las isoformas, y solamente se detectaron una o dos masas peptídicas únicas para cada isoforma, o compartidas por varias, pero no por todas las isoformas (figura 4.19). En el supuesto caso de ser producto de genes

distintos, las diferencias en los espectros PMF de las isoformas deberían ser mucho más notables, dado que, aún conservando un elevado grado de homología, las diferencias aminoacídicas se repartirían en toda la secuencia y no se hallarían concentradas en una región determinada.

Por otra parte, en los espectros PMF se observa una masa peptídica de 1605,8, presente sólo en las isoformas c2, c3/c5 y c6, cuya secuencia empareja con una secuencia localizada en la región N-terminal (aminoácidos 8-17) de una isoforma de subunidad C de *Aplysia* (Beushausen *et al*., 1988; 1992); este resultado indica claramente que las isoformas c2, c3/c5 y c6 difieren de de c1 y c4 en la región N-terminal. Curiosamente, en los espectros correspondientes a c1 y c4 se detectó una masa de 1059,6, no compartida por el resto de isoformas, que podría corresponder a una secuencia de la región N-terminal de c1 y c4, aunque desafortunadamente esta secuencia no pudo ser determinada.

La existencia de isoformas de subunidad C, generadas por corte y empalme alternativo de diferentes exones nº 1, y que por tanto difieren en la región N-terminal, ha sido ampliamente demostrada, tanto en mamíferos como en diferentes especies de invertebrados. Así, por ejemplo, en mamíferos, se conocen dos variantes codificadas por el gen Cα, denominadas Cα y Cα2 (o Cs), generadas por corte y empalme alternativo de dos diferentes exones 1 (San Agustin *et al*., 1998; 2000; Desseyn *et al*., 2000; Reinton *et al*., 2000). En el molusco *Aplysia* se han identificado cuatro variantes isoenzimáticas por combinación de dos diferentes secuencias en el extremo N-terminal –codificadas por los exones N1 y N2– con dos diferentes secuencias en medio de la cadena peptídica –codificadas por los exones A1 y A2. La isoforma que contiene la secuencia codificada por N1 es homóloga de la isoforma Cα de mamíferos (Beushausen *et al*., 1988; 1992). En las garrapatas *Amblyomma americanum* y *Amblyomma hebraeum* se han clonado los ADNc de tres isoformas que se diferencian en sus extremos N-terminales. La denominada C1 es un 83% idéntica a Cα; en cambio, las isoformas C2 y C3 poseen secuencias N-terminales muy largas y con poca homología con las secuencias correspondientes a isoformas de mamíferos (Palmer *et al*., 1999; Tabish *et al*., 2006). Finalmente en el nematodo *Caenorhabditis elegans* se han identificado también múltiples variantes de subunidad C, prodecentes del gen *kin-1*, generadas por corte y empalme alternativo de diferentes exones que codifican las regiones N y C-terminales (Gross *et al*., 1990; Tabish *et al*., 1999). La expresión de algunas de estas isoformas han sido recientemente investigada mediante el uso de anticuerpos específicos (Bowen *et al*., 2006).

Una de las diferencias más características entre las isoformas de subunidad C generadas por corte y empalme alternativo de diferentes exones 1, tanto en mamíferos como en invertebrados, es la presencia o ausencia, en el extremo N-terminal de un motivo estructural de miristilación –secuencia GNAA. Por ejemplo, la isoforma Cα de mamíferos contiene ácido mirístico unido a la

Gly N-terminal, mientras que la isoforma Cα2 –específica de espermatozoides– carece de este motivo estructural y posee, en cambio, una molécula de ácido acético unido a una Ala N-terminal. Una isoforma homóloga de Cα2 ha sido identificada recientemente en esperma de peces (Itoh *et al*., 2003). De la misma manera, sólo alguna de las isoformas identificadas en *Aplysia*, *Amblyommma* o *Caenorhabditis,* poseen la secuencia de miristilación, y en consecuencia un resto de ácido mirístico en el extremo N-terminal. Por tanto, es muy probable que, al igual que ocurre en estas especies de invertebrados, las isoformas de subunidad C de mejillón, con diferencias estructurales localizadas en la región N-terminal, se correspondan con formas miristiladas y no miristiladas de la enzima.

La existencia de variantes isoenzimáticas debidas a modificaciones post-traduccionales también ha sido demostrada en mamíferos. Diversos autores han separado, mediante cromatografía de intercambio catiónico, a partir de una preparación electroforéticamente homogénea de subunidad C, dos isoformas denominadas C_A y C_B (Kinzel *et al*., 1987; Hotz *et al*., 1989a). Estas isoformas se generan por desaminación post-traduccional de la Asn², de tal manera que la fracción C_A contiene, en realidad, una mezcla de los productos de los genes $C\alpha$ y $C\beta$ con Asp en la posición 2, mientras que la fracción C_B –la más abundante– contiene ambos productos pero con Asn en la citada posición (Jedrzejewski *et al*., 1998). Lógicamente, ambas isoformas C_A y C_B poseen exactamente la misma masa molecular, determinada mediante MS (Herberg *et al*., 1993). Aunque en un principio podría sospecharse que alguna de las isoformas de subunidad C de mejillón pudiera ser consecuencia de esta misma modificación –al igual que C_A y C_B también se separan en una cromatografía de intercambio catiónico– el hecho de que posean pequeñas, pero significativas, diferencias en sus pesos moleculares descarta esta posibilidad.

Hasta la fecha **no se han establecido claramente las diferencias funcionales entre las variantes iosenzimáticas de subunidad C** y por tanto, el significado biológico de la existencia de esta diversidad de isoformas no está claro. Sin embargo se dispone de algunos datos experimentales que sugieren que estas diferencias funcionales podrían estar relacionadas con: (*a*) la posibilidad de fosforilar diferentes conjuntos de proteínas sustrato en células diferentes o en una misma célula o (*b*) la diferente localización celular como consecuencia de su interacción directa o indirecta con estructuras celulares.

En relación con la capacidad para fosforilar diferentes proteínas sustrato, los datos aportados en este trabajo indican que **no existen diferencias significativas entre las distintas isoformas de subunidad C, en cuanto a la afinidad aparente por el péptido sustrato «kemptide» y por el péptido inhibidor PKI_{5-24}**; sin embargo las isoformas presentes en manto (c4 y c5+c6) mostraron pequeñas diferencias en cuanto a su capacidad para fosforilar *in vitro* algunas proteínas presentes en un extracto de dicho tejido. De forma similar, dos isoenzimas de subunidad C identificadas en

Aplysia -N1A1 y N2A2- fosforilan proteínas diferentes en fracciones subcelulares obtenidas de neuronas del molusco (Panchal *et al*., 1994). Estos datos sugieren que alguna isoforma de subunidad C puede poseer diferente especificidad para determinadas proteínas sustrato.

Otra diferencia funcional entre las isoformas de subunidad C **podría estar relacionada con su localización tisular o celular**, mediada por su diferente capacidad de interacción –directa o indirectamente– con proteínas de anclaje. Los resultados de la purificación (figuras 4.15 y 4.16) indican que alguna isoforma de subunidad C se expresa específicamente en un determinado tejido, o, al menos, no está presente en todos los tejidos. Este es el caso, por ejemplo de la isoforma c4, detectada en manto pero no en MAP; y lo contrario ocurre con la isoforma c2. Dentro de cada tejido, es muy probable que estas isoformas, al igual que ocurre con R_{myt1} y R_{myt2}, se expresen en una determinada población celular. La diferente localización tisular y celular de subunidades C podría ocurrir de manera indirecta, a través de su asociación con R_{myt1} o R_{myt2} –las cuales, como se ha descrito en el capítulo 4.3, poseen en general una diferente distribución dentro de la célula– o bien de manera directa mediante la interacción con proteínas de anclaje. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, y que describiremos en el siguiente capítulo, indican que una fracción de subunidad C de MAP se halla posiblemente asociada a los filamentos delgados de las fibras musculares a través de la interacción con una proteína de unión a actina, que actuaría como proteína de anclaje.

La capacidad de interacción de las diferentes isoformas de subunidad C de mejillón con las subunidades R_{myt1} y R_{myt2} no ha sido investigada, pero en principio, la combinación de cinco subtipos de subunidad C con dos diferentes isoformas de subunidad R, posibilita la generación de, al menos, diez holoenzimas diferentes de PKA. Sin embargo, los datos de distribución tisular sugieren que cada isoforma de subunidad C se halla asociada *in vivo* preferentemente con R_{myt1} o con R_{myt2}. Por ejemplo, es probable que la isoforma c4, mayoritaria en manto, se halle asociada a R_{myt2}, la isoforma de subunidad R predominante en este tejido; de la misma manera, en MAP, la isoforma c2, específica de este tejido, debería interaccionar preferentemente con R_{myt1}. Por tanto, parece más lógico pensar que ***in vivo*** **existe un número más limitado de holoenzimas PKA funcionalmente diferentes**.

4.6. Identificación de una proteína presente en MAP que co-purifica con la subunidad C

4.6.1. RESULTADOS

En la preparación de subunidad C obtenida a partir de MAP observamos de forma sistemática la presencia de una cantidad significativa de una proteína de alto peso molecular; a diferencia del resto de proteínas contaminantes minoritarias presentes en esta preparación, esta proteína de alto peso molecular es retenida, al igual que la subunidad C, en la columna Mono-S, y co-eluida con la isoforma c2, al aplicar el gradiente de ClNa (ver figura 4.15B, proteína señalada con «?»). La fracción 21 del cromatograma de la figura 4.15A, se utilizó como muestra en los estudios de caracterización e identificación de esta proteína, que se describen a continuación.

Los datos obtenidos del análisis mediante SDS-PAGE, en un gel de poliacrilamida al 7,5%, indican que se trata de una proteína formada por una o varias subunidades iguales, con un peso molecular aparente de 230,8 kDa (figura 4.23A). Por otra parte, mediante isoelectroenfoque, se estimó su pH isoeléctrico, que resultó ser 5,6 (figura 4.23B). Se trata, por tanto, de una proteína con predominio de aminoácidos ácidos, que a pH 7,0 debería poseer una carga neta negativa, y por tanto, no debería ser retenida por un intercambiador catiónico. Este hecho sugiere que su unión a la columna Mono-S, a pH 7,0, podría ocurrir, de manera indirecta, a través de su interacción con la subunidad C.

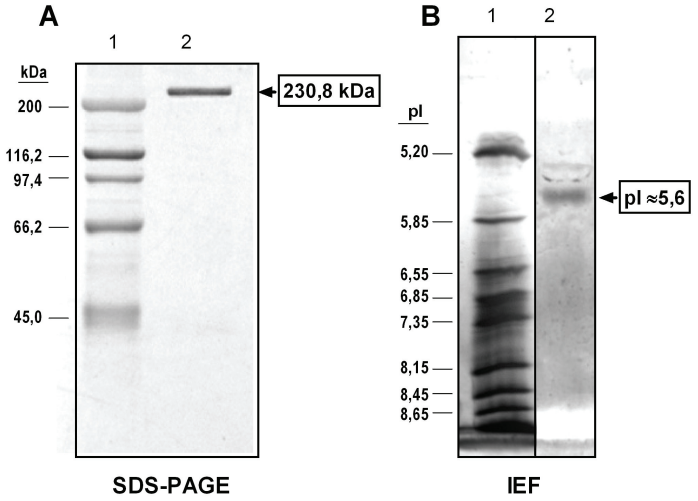


Figura 4.23. Determinación del peso molecular y pH isoeléctrico de una proteína que copurifica con una isoforma de subunidad C de MAP. (**A**) El peso molecular se determinó mediante SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 7,5%. *Calle 1*, marcadores de peso molecular; *calle 2*, muestra (3,5 µg proteína) de la fracción 21 del cromatograma 4.15A. (**B**) El *pI* se determinó mediante isoelectroenfoque. *Calle 1*, marcadores de *pI*; *calle 2*, muestra (0,5 µg de proteína) de la fracción 21 del cromatograma 4.15A.

La posibilidad interesante de que esta proteína de 230 kDa pueda interaccionar *in vivo* con la subunidad C, nos llevó a plantearnos como objetivo su identificación. Para ello, una muestra de la misma se sometió a una digestión tríptica «en gel», y la mezcla peptídica obtenida se analizó

mediante MALDI-TOF MS. Como era esperable, la identificación directa de la proteína mediante comparación del espectro PMF obtenido (figura 4.24) no fue posible; por tanto, algunos de los péptidos obtenidos fueron seleccionados y secuenciados por fragmentación mediante MALDI-TOF/TOF MS. Las secuencias obtenidas, correspondientes a los picos señalados con una flecha en el espectro de masas, se muestran en el inserto de la figura 4.24

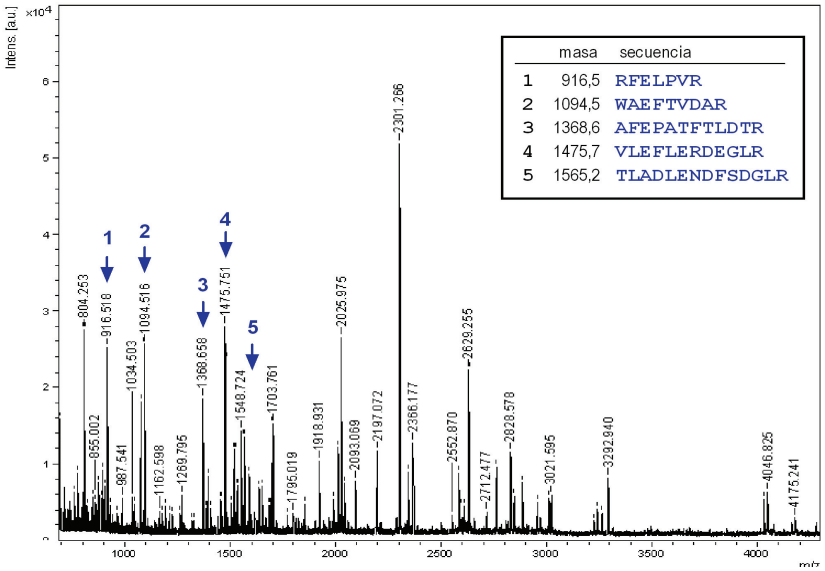


Figura 4.24. Espectro de masas correspondiente a la proteína p230. Una muestra de la proteína p230 se sometió a una digestión tríptica «en gel», y la mezcla de péptidos obtenidas se analizó mediante MALDI-TOF-MS. Los péptidos cuyas masas se señalan con una flecha fueron seleccionados para determinar su secuencia aminoácídica mediante MALDI-TOF/TOF MS. Las secuencias de estos péptidos se muestran en el inserto de la figura.

El rastreo de secuencias similares en proteínas conocidas, utilizando el programa «BLAST», identificó una clara homología con la filamina, una proteína de unión a actina, presente tanto en mamíferos como en otros organismos. El grado de homología global de los cinco péptidos en su conjunto con diferentes tipos de filamina fue el siguiente: 66% con filamina A humana (UniProt P21333, Gorlin *et al*., 1990) y de ratón (UniProt Q8BTM8); 60% con filamina B humana (UniProt O75369, Takafuta *et al*., 1998); 64% con filamina C humana (UniProt Q14315, Xie *et al*., 1998); 58% con filamina de pollo (GenBank BAB63943) y con filamina de *Drosophila* (GenBank AF188360, Sokol *et al*., 1999). La figura 4.25A muestra el alineamiento de las secuencias obtenidas de mejillón, con las regiones homólogas de la filamina A humana. Como se observa, los péptidos 4 y 5 emparejan con secuencias localizadas en el dominio de unión a actina N-terminal, mientras que los péptidos 1-3 tienen secuencias homólogas en las repeticiones de 96 aminoácidos con estructura en hoja β, características de la filamina (ver figura 4.25B).

A

```
SSSHSRAGQSAAGAAPGGGVDTRDAEMPATEKDLAEDAPWKKIQQNTFTRWCNEHLKCVSKRIANLQTDLSDGLR
                                                            TIADLENDFSDGLR
LIALLEVLSQKKMHRKHNQRPTFRQMQLENVSVALEFLDR-ESIKLVSIDSKAIVDGNLKLILGLIWTLILHYSI
                                        VLEFLERDEGIR

SMPMWDEEEDEEAKKQTPKQRLLGWIQNKLPQLPITNFSRDWQSGRALGALVDSCAPGLCPDWDSWDASKPVTNA
REAMQQADDWLGIPQVITPEEIVDPNVDEHSVMTYLSQFPKAKLKPGAPLRPKLNPKKARAYGPGIEPTGNMVKK
RAEFTVETRSAGQGEVLVYVEDPAGHQEEAKVTANNDKNRTFSVWYVPEVTGTHKVTVLFAGQHIAKSPFEVYVD
KSQGDASKVTAQGPGLEPSGNIANKTTYFEIFTAGAGTGEVEVVIQDPMGQKGTVEPQLEARGDSTYRCSYQPTM
EGVHTVHVTFAGVPIPRSPYTVTVGQACNPSACRAVGRGLQPKGVRVKETADFKVYTKGAGSGELKVTVKGPKGE
ERVKQKDLGDGVYGFEYYPMVPGTYIVTITWGGQNIGRSPFEVKVGTECGNQKVRAWGPGLEGGVVGKSADFVVE
AIGDDVGTLGFSVEGPSQAKIECDDKGDGSCDVRYWPQEAGEYAVHVLCNSEDIRLSPFMADIRDAPQDFHPDRV
KARGPGLEKTGVAVNKPAEFTVDAKHGGKAPLRVQVQDNEGCPVEALVKDNGNGTYSCSYVPRKPVKHTAMVSWG
                  WAEFTVDAR

GVSIPNSPFRVNVGAGSHPNKVKVYGPGVAKTGLKAHEPTYFTVDCAEAGQGDVSIGIKCAPGVVGPAEADIDFD
IIRNDNDTFTVKYTPRGAGSYTIMVLFADQATPTSPIRVKVEPSHDASKVKAEGPGLSRTGVELGKPTHFTVNAK
AAGKGKLDVQFSGLTKGDAVRDVDIIDHHDNTYTVKYTPVQQGPVGVNVTYGGDPIPKSPFSVAVSPSLDLSKIK
VSGLGEKVDVGKDQEFTVKSKGAGGQGKVASKIVGPSGAAVPCKVEPGLGADNSVVRFLPREEGPYEVEVTYDGV
PVPGSPFPLEAVAPTKPSKVKAFGPGLQGGSAGSPARFTIDTKGAGTGGLGLTVEGPCEAQLECLDNGDGTCSVS
YVPTEPGDYNINILFADTHIPGSPFKAHVVPCFDASKVKCSGPGLERATAGEVGQFQVDCSSAGSAELTIEICSE
AGLPAEVYIQDHGDGTHTITYIPLCPGAYTVTIKYGGQPVPNFPSKLQVEPAVDTSGVQCYGPGIEGQGVFREAT
TEFSVDARALTQTGGPHVKARVANPSGNLTETYVQDRGDGMYKVEYTPYEEGLHSVDVTYDGSPVPSSPFQVPVT
                                                            RFELPVR

EGCDPSRVRVHGPGIQSGTTNKPNKFTVETRGAGTGGLGLAVEGPSEAKMSCMDNKDGSCSVEYIPYEAGTYSLN
VTYGGHQVPGSPFKVPVHDVTDASKVKCSGPGLSPGMVRANLPQSFQVDTSKAGVAPLQVKVQGPKGLVEPVDVV
DNADGTQTVNYVPSREGPYSISVLYGDEEVPRSPFKVKVLPTHDASKVKASGPGLNTTGVPASLPVEFTIDAKDA
GEGLLAVQITDPEGKPKKTHIQDNHDGTYTVAYVPDVTGRYTILIKYGGDEIPFSPYRVRAVPTGDASKCTVTVS
IGGHGLGAGIGPTIQIGEETVITVDTKAAGKGKVTCTVCTPDGSEVDVDVVENEDGTFDIFYTAPQPGKYVICVR
FGGEHVPNSPFQVTALAGDQPSVQPPLRSQQLAPQYTYAQGGQQTWAPERPLVGVNGLDVTSLRPFDLVIPFTIK
KGEITGEVRMPSGKVAQPTITDNKDGTVTVRYAPSEAGLHEMDIRYDNMHIPGSPLQFYVDYVNCGHVTAYGPGL
THGVVNKPATFTVNTKDAGEGGLSLAIEGPSKAEISCTDNQDGTCSVSYLPVLPGDYSILVKYNEQHVPGSPFTA
RVTGDDSMRMSHLKVGSAADIPINISETDLSLLTATVVPPSGREEPCLLKRLRNGHVGISFVPKETGEHLVHVKK
NGQHVASSPIPVVISQSEIGDASRVRVSGQGLHEGHTFEPAEFIIDTRDAGYGGLSLSIEGPSKVDINTEDLEDG
                                        AFEPATFTIDTR

TCRVTYCPTEPGNYIINIKFADQHVPGSPFSVKVTGEGRVKESITRRRRAPSVANVGSHCDLSLKIPEISIQDMT
AQVTSPSGKTHEAEIVEGENHTYCIRFVPAEMGTHTVSVKYKGQHVPGSPFQFTVGPLGEGGAHKVRAGGPGLER
AEAGVPAEFSIWTREAGAGGLAIAVEGPSKAEISFEDRKDGSCGVAYVVQEPGDYEVSVKFNEEHIPDSPFVVPV
ASPSGDARRLTVSSLQESGLKVNQPASFAVSLNGAKGAIDAKVHSPSGALEECYVTEIDQDKYAVRFIPRENGVY
LIDVKFNGTHIPGSPFKIRVGEPGHGGDPGLVSAYGAGLEGGVTGNPAEFVVNTSNAGAGALSVTIDGPSKVKMD
CQECPEGYRVTYTPMAPGSYLISIKYGGPYHIGGSPFKAKVTGPRLVSNHSLHETSSVFVDSLTKATCAPQHGAP
GPGPADASKVVAKGLGLSKAYVGQKSSFTVDCSKAGNNMLLVGVHGPRTPCEEILVKHVGSRLYSVSYLLKDKGE
YTLVVKWGHEHIPGSPYRVVVP
```

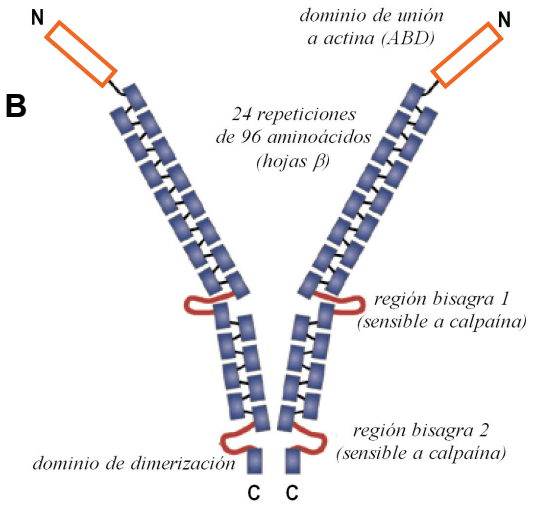


Figura 4.25. **(A)** Comparación de las secuencias de los péptidos procedentes de la proteína p230 (en color azul) con regiones homólogas de la filamina A humana (UniProt P2133). Los aminoácidos idénticos se señalan sombreados en gris. Enmarcado en un cuadro naranja se muestra el dominio de unión a actina y en cuadros rojos las regiones bisagra de la filamina. (**B**) Esquema de la estructura de la filamina A con los diferentes dominios: dominio de unión de actina (naranja), repeticiones de 96 aminoácidos con predominio de hojas β (azul) y regiones bisagra (rojo). Adaptado de Stossel *et al.*, 2001.

En resumen, el análisis estructural demuestra claramente que la proteína de 230 kDa presente en las preparaciones de subunidad C de MAP de mejillón, y que co-purifica con la isoforma c2 en una cromatografía Mono-S, es una proteína homóloga de la filamina. Esta identificación fue confirmada por el resultado del análisis mediante inmunotransferencia, en el que la proteína de 230 kDa fue reconocida por un anticuerpo policlonal generado frente a filamina A de pollo (figura 4.26).

La proteína de mejillón es ligeramente más pequeña que su homóloga de mamíferos (230 *vs* 280 kDa) y muestra un valor de *p*I muy similar al *pI* teórico de la filamina A humana, determinado a partir de su secuencia (5,6 *vs* 5,73).



Figura 4.26. La proteína p230 es reconocida por un anticuerpo anti-filamina. Una muestra de la fracción 21 del cromatograma 4.15A fue analizada mediante inmunotransferencia con un anticuerpo policlonal anti-filamina de pollo. *Calle 1*: 120 ng de proteína; *calle 2*; 240 ng de proteína.

Dado que la filamina de mejillón, en contra de la que determina su valor de *pI*, es retenida por un intercambiador catiónico a pH 7,0, nos planteamos investigar la posibilidad contraria, es decir, que la filamina pueda ser retenida por un intercambiador aniónico. Para ello, una muestra de la preparación enzimática de subunidad C de MAP, que contiene, además de subunidad C, filamina y otras proteínas contaminantes (ver figura 4.27B, calle A), se aplicó a una columna Mono-Q en un equipo FPLC, obteniéndose el cromatograma que se muestra en la figura 4.27A. El análisis de las fracciones recogidas, mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie, reveló que la mayor parte de subunidad C, de acuerdo con su *pI* > 8, no fue retenida por el intercambiador, y eluyó en el lavado de la columna (figura 4.27B, fracción 4). Al contrario, la mayoría de las proteínas contaminantes, que en la cromatografía Mono-S eluían en el lavado, fueron ahora lógicamente retenidas, y eluidas al aplicar el gradiente de sal. La única excepción a este patrón lógico, lo constituye la filamina, que siendo retenida por la columna Mono-S, fue también fijada fuertemente por la resina Mono-Q, y solamente fue eluída a una concentración de sal 0,27 M (fracciones 15 y 16). A pesar de que mediante tinción con Coomassie no se detectó en estas fracciones la presencia de subunidad C, el análisis mediante inmunotransferencia –mucho más sensible– con un

anticuerpo anti-Cα sí reveló la presencia de subunidad C en las fracciones 15 y 16 (figura 4.27C). Este resultado interesante demuestra nuestro planteamiento de que una fracción de subunidad C co-eluye con la filamina en una cromatografía de intercambio aniónico. El hecho de que el peso molecular de la subunidad C detectada en las fracciones 15 y 16 coincida con el de la isoforma c2, utilizada como control (c), apoya la idea de que es esta isoforma la que interacciona con la filamina.

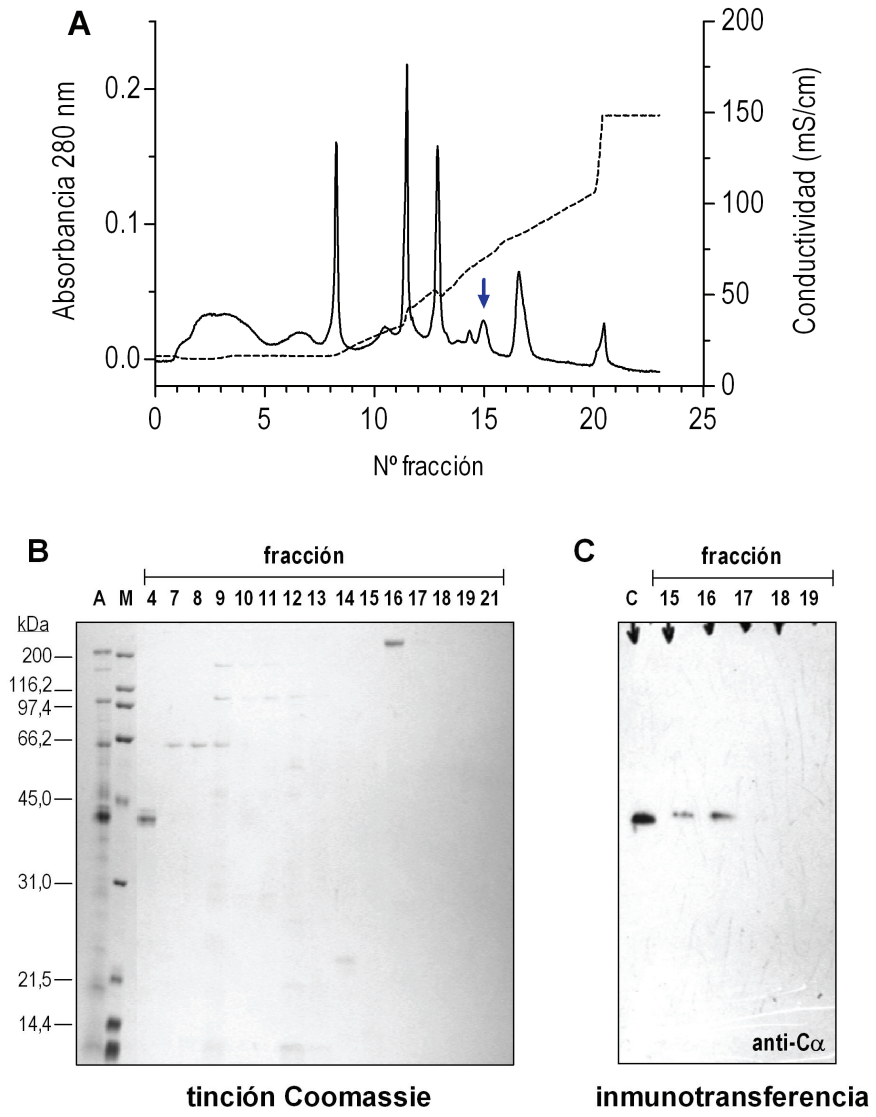


Figura 4.27. Copurificación de la proteína p230 y la subunidad C en una cromatografía de intercambio aniónico. (**A**) Una muestra de la preparación enzimática de subunidad C purificada a partir de MAP se aplicó a una columna Mono-Q–FPLC. (**A**) Cromatograma obtenido, en el que se señala con una flecha la elucción de la filamina. (**B**) Análisis de las fracciones recogidas (1 ml) mediante SDS-PAGE al 10% y tinción con azul de Coomassie. A, muestra aplicada a la columna; M, marcadores de peso molecular. (**C**) Análisis de las fracciones recogidas mediante inmunotransferenca con un anticuerpo anti-subunidad Cα humana. C, control: 20 ng de la isoforma c2.

Para determinar si la filamina de MAP puede ser sustrato de la subunidad C, una muestra de la proteína p230 se incubó con subunidad C (isoforma c2) en presencia de Cl_2Mg y [γ-^{32}P]ATP].

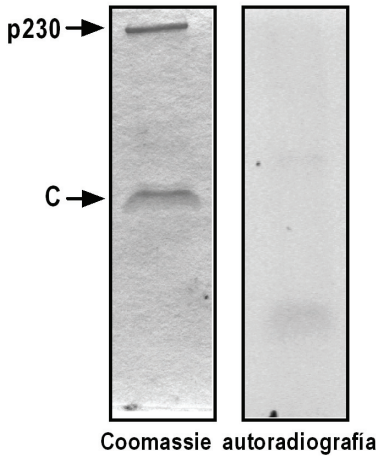


Figura 4.28. Análisis de la fosforilación *in vitro* de la proteína p230 por la subunidad C. Una muestra de la fracción 23 del cromatograma 4.15A (1,5 mg proteína) se incubó a temperatura ambiente con subunidad C (isoforma c2, 0,01 unidades/µg de filamina) en presencia de Cl_2Mg 5 mM y [γ-^{32}P]ATP 0,2 mM (~600 cpm/pmol). Transcurridos 5 min, se pararon las reacciones y se analizaron las muestras mediante SDS-PAGE y autoradiografía.

Como se observa en la autoradiografía de la figura 4.28, no se observó ninguna banda marcada en la zona correspondiente a 230 kDa, lo que indica que la filamina no es fosforilada *in vitro* por la subunidad C.

4.6.2. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos identificado una proteína de 230 kDa (p230) presente de forma sistemática en las preparaciones de subunidad C purificada a partir de MAP. A pesar de poseer un valor de *pI* en torno a 5,6, la proteína p230 se une a una columna de intercambio catiónico (Mono-S) equilibrada a pH 7,0, y co-eluye de esta columna junto con una de las isoformas de subunidad C (c2). Por otra parte y de acuerdo con su *pI*, la proteína p230 presente en la preparación de subunidad C, se une a una columna de intercambio aniónico (Mono-Q) siendo eluida a una concentración de ClNa 0,27 M. Junto con ella co-eluye también una fracción de subunidad C –que por su peso molecular se corresponde con la isoforma c2– a pesar de que por su valor de *pI* (>8,0) no debería ser retenida en esta columna. Estos datos de **doble co-purificación** indican que **una fracción de subunidad C se halla asociada *in vivo* con la proteína p230** mediante algún tipo de interacción.

Los datos estructurales nos permitieron **identificar inequívocamente la proteína p230 como** una proteína homóloga de **la filamina**; de acuerdo con los datos de secuencia, la proteína p230 fue reconocida por un anticuerpo policlonal anti-filamina de pollo.

La **filamina pertenece a la familia de proteínas de unión a actina**. En mamíferos se han identificado tres proteínas homólogas denominadas filamina A, filamina B y filamina C, con un 70% de homología en sus secuencias y una estructura similar. La filamina C, también conocida como ABP-L, filamina 2 o filamina γ, está presente en músculo esquelético (Thompson *et al*., 2000; van der Ven *et al*., 2000). En organismos diferentes a mamíferos, se han identificado proteínas ortólogas en pollo (Barry *et al*., 1993; Tachikawa *et al*., 1997), en invertebrados como *Drosophila* (Sokol y Cooley, 1999) y *Caenorhabditis elegans* (Wilson *et al*., 1994), y en *Dyctiostelium* (Hock y Condeelis, 1987). Estructuralmente, la filamina posee un dominio de unión a actina, localizado en el extremo N-terminal, compuesto a su vez de dos dominio homólogos de la calponina (CH1 y CH2) presentes también en otras proteínas de unión a actina. El resto de la molécula está formada por un número variable de repeticiones –la filamina humana contiene 24– de 96 aminoácidos. En conjunto, cada repetición presenta una estructura secundaria que consiste en un «sandwich» de hojas β, un plegamiento similar al encontrado en la familia de las inmunoglobulinas. La repetición C-terminal es responsable de la función de dimerización. Cada monómero de filamina posee, además, dos largas regiones bisagra, sensibles a calpaína, que confieren flexibilidad a la molécula; en la filamina A humana las regiones bisagra se sitúan entre las repeticiones 15–16, y 23–24 (ver figura 4.25B) (revisión: van der Flier y Sonnenberg, 2001; Stossel *et al*., 2001).

En cuanto a su función, inicialmente la filamina fue considerada como **una molécula organizadora del citoesqueleto celular**, puesto que puede establecer puentes cruzados entre filamentos de actina y anclar estos filamentos a proteínas de membrana. Sin embargo, en los trabajos más recientes, se ha demostrado que las filaminas de vertebrados pueden establecer interacciones con más de veinte proteínas diferentes, que han puesto de manifiesto **nuevas**, e igualmente importantes, **funciones de esta proteína**. Entre estas proteínas asociadas con filamina citamos las siguientes: (*a*) proteínas transmembranales, como caveolina-1 (que reviste las invaginaciones de la membrana plasmática denominadas caveolas), integrina o receptor de matriz extracelular (ECM), migfilina (reorganizadora de filamentos de actina), epitina (serina proteasa trasmembrana tipo II) o receptor de calcio; (*b*) proteínas citosólicas de señalización, como furina (que participa en la maduración de proteínas mediante proteolisis), factor de transcripción FEBP2, o proteína quinasa C; y (*c*) proteínas nucleares, como receptor de andrógenos, proteína quinasa SEK-1, factor de transcripción FOX-C1 o el factor de supresión tumoral BRCA-2. En conjunto, las publicaciones recientes revelan que la filamina desempeña posiblemente un **papel importante en procesos de señalización**, implicados en la reorganización del citoesqueleto celular; además funciona probablemente, en muchos casos, como una **proteína «andamio» molecular**, con múltiples sitios de unión, que permite: (*i*) anclar receptores de membrana a la actina del citoesqueleto, facilitando de este modo la localización precisa de receptores y otras proteínas de

membrana, y (*ii*) la co-localización dentro del espacio celular de proteínas que participan en una determinada vía de señalización celular (revisiones: van der Flier *et al*., 2001; Feng y Walsh, 2004; Popowicz *et al*., 2006). El importante papel fisiológico de la filamina, todavía poco conocido, ha quedado patente en recientes estudios genéticos, que han demostrado que mutaciones que afectan al gen de esta proteína originan diversas enfermedades y malformaciones en el cerebro, los huesos o el sistema cardiovascular (Feng y Walsh, 2004; Robertson, 2005).

Los resultados aportados por nosotros en este capítulo indican que, en tejido MAP de mejillón, **una proteína homóloga de la filamina de mamíferos puede interaccionar con una isoforma de subunidad C de la PKA**. Hasta la fecha **no existen datos en la bibliografía acerca de esta asociación filamina-PKA**, y por tanto, la subunidad C se añade por primera vez a la lista, cada vez más numerosa, de proteínas que interaccionan con filamina. Al mismo tiempo, se demuestra que el papel de la filamina como proteína «andamio» en procesos de señalización celular también está presente en invertebrados.

En los últimos años se han publicado trabajos que demuestran la interacción de la filamina con proteína quinasas. Un ejemplo lo constituye la proteína quinasa C (PKCα) que se halla asociada con filamina a nivel de la membrana plasmática. La activación de la PKC y la subsiguiente fosforilación de la filamina influye en la interacción de ésta con otras proteínas denominadas integrinas, regulando la asociación de la actina cortical con la membrana plasmática, y afectando a funciones como la adhesión o la migración celular (Tigges *et al*., 20003). A diferencia de lo que ocurre en este caso, la proteína homóloga a la filamina de mejillón no es sustrato de la PKA, a la que probablemente se halla asociada.

¿Cuál puede ser el papel de la filamina en el proceso de señalización, mediado por PKA, en MAP de mejillón?. La PKA desempeña un papel clave, ampliamente demostrado, en la regulación del mecanismo de contracción «catch», específico de estos músculos de bivalvos (ver introducción, apartado 1.4.4.2). Según la hipótesis más reciente, el estado de contracción «catch», –caracterizado por un bajo consumo de ATP– se mantiene gracias a la interacción de la twitchin –una proteína de alto peso molecular presente en los filamentos gruesos de estos músculos– con la actina de los filamentos delgados, una vez que cesa la contracción activa y se rompen los puentes cruzados actina-miosina (Siegman *et al*., 1998; Funabara *et al*., 2003; Shelud´ko *et al*., 2004; 2007; Andruchova *et al*., 2005; Andruchov *et al*., 2006; Butler *et al*., 2006). Para que esta interacción ocurra es necesario que, al menos, la proteína twitchin se halle defosforilada (Siegman *et al*., 1997). La activación de la PKA, como consecuencia de la liberación de serotonina, fosforila esta proteína en varios residuos, y en consecuencia, se produce la relajación del músculo, es decir, la liberación del «catch» (Siegman *et al*., 1998; Funabara *et al*., 2003). Una vez estimulada de nuevo la contracción

muscular, y como consecuencia de la liberación de Ca^{2+} al citoplasma y la activación de la proteína fosfatasa 2A, la twitchin es defosforilada para poder interaccionar de nuevo con la actina y establecer el «catch» (Yamada *et al*., 2004).

En nuestro laboratorio hemos comprobado que, además de la twitchin, la actina de MAP también es fosforilada *in vitro* por la subunidad C del molusco (Béjar y Villamarín, 2006; ver capítulo 4.5, figura 4.22), y sería necesario investigar si la ruptura de la interacción twitchin-actina, para la relajación del estado «catch», requiere la fosforilación de ambas proteínas, y no sólo de la primera.

Nosotros **proponemos la hipótesis de que la filamina podría actuar**, en este caso, **anclada sobre los filamentos delgados del MAP** a través de sus dominios de unión a actina, **como una proteína «andamio» para co-localizar la PKA** –y tal vez otros elementos de esta vía de señalización– **con sus proteínas sustrato** en este tejido: twitchin y, tal vez, actina. Durante el «catch», la subunidad C –probablemente la isoforma c2– asociada a la filamina, se mantendría inactiva gracias a su unión con la subunidad R –probablemente R_{myt1}; la liberación de serotonina, y el consecuente incremento en los niveles de AMPc, induciría la disociación de la subunidad R, quedando la subunidad C libre y activa para fosforilar las proteínas sustrato presentes en su entorno y liberar el «catch».

Hasta la fecha se conoce que la localización de la PKA en el entorno de sus sustratos fisiológicos ocurre a través de la interacción de la subunidad R con las proteínas de anclaje denominadas AKAPs; sin embargo, en este caso, parece que la co-localización puede tener lugar a través de la subunidad C y su interacción con la filamina.

5 conclusiones

CONCLUSIONES

1. Los datos estructurales de secuencia demuestran que **R_{myt2} es una subunidad R tipo II**. Por tanto, en mejillón existen, al menos dos tipos de subunidad R, denominadas R_{myt1} y R_{myt2}, homólogas respectivamente de las subunidades tipo I y tipo II de mamíferos.

2. Sólo **la isoforma R_{myt2} es fosforilada *in vitro* por CK2;** este proceso **disminuye notablemente su capacidad para inhibir la subunidad C**, en ausencia de AMPc. Por tanto, la fosforilación por CK2 de la subunidad R, también observada en mamíferos, podría constituir un nuevo mecanismo de activación de la PKA, aparte de la activación alostérica por AMPc.

3. R_{myt1} y R_{myt2} tienen **un patrón de distribución tisular y celular complementario**. R_{myt1} es mayoritaria en músculos «catch» y en hepatopáncreas, mientras que R_{myt2} predomina en manto-gónada. En general, dentro de cada tejido, ambas isoformas se distribuyen de forma complementaria en diferentes poblaciones celulares, o en diferentes regiones y/o estructuras de una misma célula.

4. Tanto **PKA_{myt1} como PKA_{myt2} son activadas específicamente por AMPc** y no por GMPc. PKA_{myt1} es dos veces más sensible a la activación por AMPc que PKA_{myt2}.

5. La actividad proteína quinasa de **PKA_{myt2} es muy dependiente de la temperatura**, especialmente a temperaturas superiores a 15 ºC. Dado que esta forma se localiza en los flagelos de los espermatozoides, **la temperatura del agua de mar podría ser un factor importante en el proceso de fecundación** a través de la regulación de la motilidad del esperma.

6. En mejillón existen, al menos, **cinco isoformas diferentes de subunidad C** de la PKA, algunas de las cuales no se expresan en todos los tejidos. Los datos estructurales revelan diferencias en la región N-terminal, e indican que probablemente **se generan por corte y empalme alternativo**, a partir de un único gen.

7. Se observa una notable homología entre las isoformas de **subunidad C** de mejillón y la subunidad C de mamíferos, lo que confirma que se trata de **una proteína muy conservada** en la evolución.

8. **No** existen **diferencias significativas** entre las diferentes isoformas de subunidad C en cuanto a sus características **cinéticas**.

9. Una proteína homóloga de **la filamina co-purifica con** una fracción de **subunidad C** de MAP (probablemente la isoforma c2), y viceversa. Estos datos indican que probablemente ambas proteínas –filamina y subunidad C– se hallan **asociadas *in vivo***. Se propone la siguiente hipótesis: la filamina podría actuar como un «andammio» molecular para co-localizar la PKA con sus proteínas sustrato en las fibras musculares, en el proceso de regulación del mecanismo de contracción «catch».

6 bibliografía

A

Adams, J.A. y Taylor, S.S. (1992) Energetic limits of phosphotransfer in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase as measured by viscosity experiments *Biochemistry*, 31, 8516-8522.

Adams, J.A. y Taylor, S.S. (1993) Phosphorylation of peptide substrate for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*., 268, 7747-7752.

Adams, J.A., McGlone, M.L., Gibson, R. y Taylor, S.S. (1995) Phosphorylation modulates catalytic function and regulation in the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 34, 2447-2454.

Advani, S.R., Schwarz, M., Showers, M.O., Maurer, R.A. y Hemmings, A. (1987) Multiple mRNA species code for the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase from LLC-PK_1 cells evidence for two forms of the catalytic subunit. *Eur. J. Biochem*., 167, 221-226.

Akamine, P., Madhusudan, Wu, J., Xuong, N-h., Ten Eyck, L.F. y Taylor, S.S. (2003) Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme cristal structure. *J. Mol. Biol*., 327, 159-171.

Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B. y Cohen, P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol*., 7, 261-269.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. Gapped (1997) BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res*., 25, 3389-3402.

Amieux, P.S. y McKnight, G.S. (2002) The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity. *Ann. N.Y. Acad. Sci*., 968, 75-95.

Andersen, M.D., Shaffer, J., Jennings, P.A. y Adams, J.A. (2001) Structural characterization of protein kinase A as a function of nucleotide binding. Hydrogen-deuterium exchange studies using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry detection. *J. Biol. Chem*., 276, 14204-14211.

Anderson, C.M., Zucker, F.H. y Steitz, T.A. (1979) Space-filling models of kinase clefts and conformation changes. *Science,* 204, 375-380.

Anderson, D., Koch, C.A., Grey, L., Ellis, C., Moran, M.F. y Pawson, T. (1990) Binding of SH2 domains of phospholipase C gama 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science,* 250, 979-982.

Andrews, E.B. (1988) Excretory systems of molluscs. En: *The Mollusca*, vol. 11 (Eds. Truman, E.R y Clarke, M.R.), pp. 381-448, Academic Pres, New York.

Andrews, E.B. y Jennings, K.H. (1993) The anatomical and ultrastructural basis of primary urine formation in bivalve molluscs. *J. Moll. Stud.*, 59, 223-257.

Andruchov, O., Andruchova, O. y Galler, S. (2006) The catch state of mollusc catch muscle is established during activation: experiments on skinned fibre preparations of the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis* L. using the myosin inhibitors orthovanadate and blebbistatin. *J. Exp. Biol.*, 209, 4319-4328.

Andruchova, O., Höpflinger, M.C., Andruchov, O. y Galler, S. (2005) No effect of twitchin phosphorylation on the rate of myosin head detachment in molluscan catch muscle: are myosin heads involved in the catch state?. *Pflügers Arch.*, 450, 326-334.

Angelo, Robert. Y Rubin, Ch.S. (1998) Molecular characterization o fan anchor protein ($AKAP_{CE}$) that binds the RI subunit (R_{CE}) of type I protein kinase a from *Caenorhadbitis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 273, 14633-14643.

Anjard, C., Etchebehere, L., Pinaud, S., Veron, M. y Reymond, C.D. (1993) An inusual catalytic subunit for the cAMP-dependent protein kinase of *Dictyostelium discoideum. Biochemistry*, 32, 9532-9538.

B

Banerjee, C. y Sarkar, D. (1991) Isolation and characterization of a cyclic nucleotide-dependent protein kinase from *Leishmania donovani. Mol. Biochem. Parasitol.*, 52, 195-206.

Banky, P., Huang, L.J-S. Y Taylor, S.S. (1998) Dimerization/docking domain of the type Iα regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 273, 35048-35055.

Banky, P., Newlon, M.G., Roy, M., Garrod, S., Taylor, S.S. y Jennings, P.A. (2000) Isoform-specific differences between the type Iα and IIα cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring domains revealed by solution NMR. *J. Biol. Chem.*, 275, 35146-35152.

Banky, P., Roy, M., Newlon, M.G., Morikis, D., Haste, N.M., Taylor, S.S. y Jennings, P.A. (2003) Related protein-protein interaction modules present drastically different surface topographies despite a conserved helical platform. *J. Mol. Biol.*, 330, 1117-1129.

Barcia, R., Cao, A., Arbeteta, J. Y Ramos-Martinez, J.I. (1999) The IL-2 receptor in hemocytes of the sea mussel *Mytilus galloprovincialis* LmK. *IUBMB Life*, 48, 419-423.

Bardales, J.R., Diaz-Enrich, M.J., Ibarguren, I. y Villamarín, J.A. (2004) Isoforms of cAMP-dependent protein kinase in the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*: activation by cyclic nucleotides and effect of temperature. *Arch. Biochem. Biophys.*, 432, 71-78.

Bardales, J.R., Hellman, U. y Villamarín, J.A. (2007) CK2-mediated phosphorylation of type II regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the mollusc Mytilus galloprovincialis. *Arch. Biochem. Biophys*., 461, 130-137.

Barford, D. (1996) Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends. Biochem. Sci*., 21, 407-412.

Barford, D. (1999) Colworth Medal Lecture. Structural studies of reversible protein phosphorylation and protein phosphatases. *Biochem. Soc. Trans.,* 27, 751-766.

Barry, C.P., Xie, J., Lemmon, V. y Youn, A.P. (1993) Molecular Characterization of a multi-prometer gene encoding a chicken filamin protein. *J. Biol. Chem*., 268, 25577-25587.

Battistutta, R., Sarno, S., De Moliner, E., Papinutto, E., Zanotti, G. Pinna L.A. (2000) The replacement of ATP by the competitive inhibitor emodin induces conformational modifications in the catalytic site of protein kinase CK2. *J. Biol. Chem*., 275, 29618-29622.

Bayne, C.J. (1990) Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *Biosci*., 40, 723-731.

Beaumont, A.R. y Abdul-Martin, A.K.M. (1994) Differences in morphology, survival and size between self and cross fertilized larvae of *Mytilus galloprovincialis. J. Mar. Biol*., 74, 445-448.

Beebe, S.J. y Corbin, J.D. (1986) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. En: *The Enzymes,* vol. 17 (Eds. Boyer P.D. y Krebs E.G.), pp. 43-111, Academic Press, Ine., Orlando, Florida.

Beebe, S.J., Oyen, O., Sandberg, M., Froysa, A., Hansson, V. y Jahnsen, T. (1990) Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C_γ) from human testis-representing a third isoforma for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Endocrinol*, 4, 465-475.

Beebe, S.T., Salomonsky, P., Jahnsen, T. y Li, Y. (1992) The Cγ subunit is a unique isozyme of the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*., 267, 25505-25512.

Béjar, P. y Villamarín, J.A. (2006) Catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from a match muscle of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*: purification, characterization, y phosphorylation of muscle proteins. *Arch. Biochem. Biophys*., 450, 133-140.

Benedict, C.V. y Picciano, P.T. (1989) Adhesives from marine mussels. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser*., 385, 465-483.

Bergold, P.J., Beushausen, S.A., Sacktor, T.C., Cheley, S., Bayley, H. y Schwartz, J.H. (1992) A regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase down-regulated in *Aplysia* sensory neurons during long-term sensitization *Neuron*, 8, 387-397

Berman, H.M., Ten Eyck, L.F., Goodsell, D.S., Haste, N.M., Kornev, A.y Taylor, S.S. (2005) The cAMP binding domain: An ancient signaling module. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 102, 45-50.

Beushausen, S., Bergold, P., Sturner, S., Elste, A., Roytenberg, V., Schwartz, H. y Bayley, H. (1988) Two catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase generated by alternative RNA splicing are expressed in *Aplysia* neurons. *Neuron*, 1, 853-864.

Beushausen, S., Lee, E., Walker, B. y Bayley, H. (1992) Catalytic subunits of *Aplysia* neuronal cAMP-dependent protein kinase with two different N termini. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 89, 1641-1645.

Bhatnagar, D., Roskoski, R., Jr, Rosendahl, M.S. y Leonard, N.J. (1983) Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: a new fluorescence displacement titration technique for characterizing the nucleotide binding site on the catalytic subunit. *Biochemistry*, 22, 6310-6317.

Bidwai, A.P., Reed, J.C. y Glover, C.V. (1993) Phosphorylation of calmodulin by the catalytic subunit of casein kinase II is inhibited by the regulatory subunit. *Arch. Biochem. Biophys*., 300, 265-270.

Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., gammeltoft, S. y Brunak, S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics,* 4, 1633-1649.

Bossemeyer, D., Engh, R.A., Kinzel, V., Ponstingl, H. y Huber, R. (1993) Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 A structure of the complex with Mn^{2+} adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI (5-24). *EMBO J*., 12, 849-859.

Boucaud-Camou, E. y Henry, M. (2003) The digestive system. En: *Atlas d'histologie et de cytology des mollusques bivalves marins* (Ed. Grizel, H.), pp. 65-116, Ifremer, Plouzané.

Bowen, L.C., Bicknell, A.V., Tabish, M., Clegg, R.A., Rees, H.H. y Fischer, M.J. (2006) Espression of multiple isoforms of the cAMP-dependent protein kinase (PK-A) catalytic subunit in the nematode, *Caenorhabditis elegans. Cell. Signal*., 18, 2230-2237.

Bracho, G.E., Fritch, J.J. y Tash, J.S. (1998) Identification of flagellar proteins that initiate the activation of sperm motility in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 242, 231-237.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*., 72, 248-254.

Bradham, C.A., Foltz, K.R., Beane, W.S., Armone, M.I., Rizzo, F., Coffman, J.A., Mushegian, A., Goel, M., Morales, J., Geneviere, A.M., Lapraz, F., Robertson, A.J., Kelkar, H., Loza-Coll, M., Townley, I.K., Raisch, M., Roux, M.M., Lepage, T., Gache, C., McClay, D.R. y Manning, G. (2006) The sea urchin kinome: A first look. *Dev. Biol*., 300, 180-193.

Breitbart, H., Rubinstein, S. y Etkovitz, N. (2006) Sperm capacitation is regulated by the crosstalk between protein kinase A and C. *Mol. Cell. Endocrinol.,* 252, 247-249.

Brinkworth, R.I., Breinl, R.A. y Kobe, B. (2003) Structural basis and prediction of substrate specificity in protein serine/threonine kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 100, 74-79.

Brown, C.H. (1952) Some structural proteins of *Mytilus edulis. Q.J. Microsc. Sci*., 92, 487-502.

Brown, P.R., Miki, K., Harper, D.B. y Eddy, E.M. (2003) A-Kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. *Biol. Reprod*., 68, 2241-2248.

Bubis, J., Neitzel, J.J., Saraswat, L.D. y Taylor, S.S. (1988) A point mutation abolishes binding of cAMP to site A in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*., 263, 9668-9673.

Bubis, J., Vedvick, T.S. y Taylor, S.S. (1987) Antiparallel alignment of the two protomers of the regulatory subunit dimmer of cAMP-dependent protein kinase I. *J. Biol. Chem*., 262, 14961-14966.

Buechler, J.A. y Taylor, S.S. (1990) Differential labelling of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase with a water-soluble carbodiimide: identification of carboxyl groups protected by MgATP and inhibitor peptides. *Biochemistry*, 29, 1937-1943.

Buechler, Y.J., Herberg, F.W. y Taylor, S.S. (1993) Regulation-defective mutants of type I cAMP-dependent protein kinase. Consequences of replacing arginine 94 and arginine 95. *J. Biol. Chem*., 268, 16495-16503.

Burnett, G. y Kennedy, E.P. (1954) The enzymatic phosphorylation of proteins. *J. Biol. Chem.,* 211, 969-980.

Burns-Hamuro, L.L., Hamuro, Y., Kim, J.S., Sigala, P., Fayos, R., Stranza, D.D., Jennings, P.A., Taylor, S.S. y Woods JR, V.L. (2005) Distinct interaction modes of an AKAP bound to two regulatory subunit isoforms of protein kinase A revealed by amide hydrogen/deuterium exchange. *Protein Sci*., 14, 2982-2992.

Burton, K.A. y McKnight, G.S. (2007) PKA, germ cells, and fertility. *Physiology*, 22, 40-46.

Butler, T.M., Mooers, S.U. y Siegman, M.J. (2006) Catch force links and the low to high force transition of myosin. *Biophys. J*., 90, 3193-3202.

C

Caenepeel, S., Charydczak, G., Sudarsanam, S., Hunter, T. y Manning, G. (2004) The mouse kinome: discover and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 101, 11707-11712.

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

Cao, A., Ramos-Martinez, J.I. y Barcia, R. (2004) Implication of PKA and PKC in the activation of the hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. by LPS and IL-2. *Mol. Immunol.*, 41, 45-52.

Cao, J., Fernández, M. y Villamarín, J.A. (1998) A method for the purification of cAMP-dependent protein kinase using immunoaffinity chromatography. *Protein Expr. Purif.*, 14, 418-424.

Cao, J., Fernández, M., Ramos-Martínez, J.I. y Villamarín, J.A. (1996) Identification of RII-binding proteins in the mollusc *Mytilus galloprovincialis. FEBS Letters*, 382, 93-96.

Cao, J., Fernández, M., Vázquez-Illanes, M.D., Ramos-Martínez, J.I. y Villamarín, J.A. (1995b) Purification and characterization of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis. Comp. Biochem. Physiol.*, 111B, 453-462.

Cao, J., Ramos-Martínez, J.I. y Villamarín, J.A. (1995a) Characterization of a cAMP-binding protein from the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis. Eur. J. Biochem.*, 232, 664-670.

Carlson, C.R., Ruppelt, A. Y Taskén, K. (2003) A kinase anchoring protein (AKAP) interaction and dimerization of the RIα and RIβ regulatory subunits of protein kinase a *in vivo* by the yeast two hybrid system. *J. Mol. Biol.*, 327, 609-618.

Carlson, G.L. y Nelson, D. (1996) The 44-kDa regulatory subunit of the *Paramecium* cAMP-dependent protein kinase lacks a dimerization domain and may have a unique autophosphorylation site sequence. *J. Euk. Microbiol.*, 43, 347-356.

Carmichael, D.F., Geahlen, R.L., Allen, S.M. y Krebs, E.G. (1982) Type II regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase phosphorylation by casein kinase II at a site that is also phosphorylation in vivo. *J. Biol. Chem.*, 257, 10440-10445.

Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., *et al*. (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science.*, 309, 1559-1563.

Carr, D.W., Haushen, Z.E., Fraser, I.D., Stofko-Hahn, R.E. y Scott, J.D. (1992) Association of the type II cAMP-dependent protein kinase with a human thyroid RII-anchoring protein. Cloning and characterization of the RII-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 267, 13376-13382.

Carr, D.W., Stofko-Hahn, R.E., Fraser, I.D., Bishop, S.M., Acott, T.S., Brennan, r.G. y Scott, J.D. (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, 14188-14192.

Carr, S.A., Biemann, K., Shoji, S., Parmelee, D.C. y Titani, K. (1982) n-tetradecanoyl is the NH_2-terminal blocking group of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 79, 6128-6131.

Castellani, L. y Cohen, C. (1992) A calcineurin-like phosphatase is required for catch contraction. *FEBS Lett*., 309, 321-326.

Cauthron, R.D., Carter, K.B., Liauw, S. y Steinberg, R.A. (1998) Physiological phosphorylation of protein kinase A at thr-197 is by a protein kinase A kinase. *Mol. Cell. Biol*., 18, 1416-1423.

Channavajhala, P. y Selding, D.C. (2002) Functional interaction of protein kinase CK2 and c-Myc in lymphomagenesis. *Oncogene*, 21, 5280-5288.

Cheng, T.C. (1981) Bivalves. En: *Invertebrate Blood Cells* (Eds. Ratcliffe, N.A. y Rowley, A.F.), pp. 231-300, Academic Press, Londres.

Cheng, T.C. (1984) A classification of molluscan hemocytes based on functional evidences. En: *Comparative Pathobiology, Invertebrate Blood Cells and Serum Factors,* vol. 6 (Ed. Cheng, T.C.), pp. 111-146, Plenum, New York.

Cheng, X., Ma, Y., Moore, M., Hemmings, B.A. y Taylor, S.S. (1998) Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 95, 9849-9854.

Cheng, X., Shaltiel, S. y Taylor, S.S. (1998) Mapping substrate-induced confarmational changes in cAMP-dependent protein kinase by protein footprinting. *Biochemistry*, 37, 14005-14013.

Cheng, Y., Zhang, Y. y McCammon, J.A. (2005) How does the cAMP-dependent protein kinase catalyze the phosphorylation reaction: An ab intio QM/MM study. *J. Am. Chem. Soc*., 127, 1553-1562.

Cheng, Y., Zhang, Y. y Mccammon, J.A. (2006) How does activation loop modulate catalytic activity in the cAMP-dependent protein kinase: A theoretical study. *Protein Sci.*, 15, 672-683.

Clegg, C.H., Cadd, C.G. y McKnight, G.S. (1988) Genetic characterization of a brain-specific from of the type Iβ regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 85, 3703-3707.

Coghlan, V.M., Hausken, Z.E. y Scott, J.D. (1995) Subcellular targeting of kinases and phosphatases by associational anchoring proteins. *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 592-596.

Coghlan, V.M., Perrino, B.A., Howard, M., Langeberg, L.K., Hicks, J.B., Gallatin, W.M. y Scott, J.D. (1995) Association of protein kinase A and protein phosphatase 2B with a common anchoring protein. *Science,* 267, 108-111.

Cohen, P. (1976). The regulation of protein function by multisite phosphorylation. *Trends Biochem. Sci*., 1, 38-40.

Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem*. 58, 453-508.

Cohen, P. (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends Biochem. Sci*., 25, 596-601.

Cohen, P. (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nat. Cell. Biol.,* 4, E127-130.

Cole, R.A. y Twarog, B.M. (1972) Relaxation of catch in a molluscan smooth muscle. I. Effects of drugs which act on the adenyl cyclase system. *Comp. Biochem. Physiol*., 43, 321-330.

Colledge, M. y Scott, J.D. (1999) AKAPs: from structure to function. *Trends Cell. Biol*., 9, 216-221.

Conrotto, P. y Hellman, U. (2005) Sulfonation chemistry as a powerful tool for MALDI TOF/TOF de novo sequencing and post-translational modification analysis. *J. Biomol. Tech*., 16, 441-452.

Cook, P., Neville, M.E.J., Vrana, K., Hartl, F.T. y Roskoski, R.J. (1982) Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase: kinetic mechanism for the bovine skeletal muscle catalytic subunit. *Biochemistry*, 21, 5794-5799.

Corbin, J.D., Keely, S.L. y Park, C.R. (1975) The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate- dependent protein kinase adipose, cardiac and ofther tissue. *J. Biol. Chem*., 250, 218-225.

Corbin, J.D., Sudgen, P.H., West, L., Flockhart, D.A., Lincoln, T.M. y McCarthy, D. (1978) Studies on the properties and mode of action of the purified regulatory subunit of bovine heart adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*., 253, 3997-4003.

Cox, S., Radzio-Andzelm, E. y Taylor, S.S. (1994) Domain movements in protein kinase. *Curr.Opin. Struct.Biol*., 4, 893-901.

Crespo, C.A. (1989) Histofisiología de las reservas bioenergéticas en el manto de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Tesis Doctoral*, Universidad de Santiago de Compostela, España.

Crespo, C.A. y Espinosa, J. (1990) Reservas bioenergéticas en *Mytilus*: estrategia celular. *Monografías de la Universidad de Santiago de Compostela*, nº 156, Servicio de Publicacións e intercambio Científico da Universidade de Santiago de Compostela.

Cummings, D.E., Brandon, E.P., Planas, J.V., Motamed, K., Idzerda, R.L. y McKnight, G.S. (1996) Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII beta subunit of protein kinase A. *Nature*, 382, 622-626.

Cytrynska, M., Wojda, I., Franjt, M. y Jakubowicz, T. (1999). PKA from *Saccharomyces cerevisiae* can be activated by cyclic AMP and cyclic GMP. *Can J. Microbiol*., 45, 31-37.

D

Dabrowska, R., Sherry, J.M., Aromatorio, D.K. y Hartshorne, D.J. (1978) Modulator protein as a component of the myosin light chain kinase from chicken gizzard. *Biochemistry,* 17, 253-258.

Daile, P., Carnegie, P.R. y Youn, J.D. (1975) Synthetic substrate for cyclic AMP-dependent protein kinase. *Nature, 257, 416-418.*

Das, R., Esposito, V., Abu-Abed, M., Anand, G.S., Taylor, S.S. y Melacini, G. (2007) cAMP activation of PKA defines an ancient signaling mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 104, 93-98.

de Gunzburg, J., Part, D., Guiso, N. y Veron, M. (1984) An Inusual Adenosine 3',5'-phosphate dependent protein kinase from *Dictyoslium discoideum*. *Biochemistry*, 23, 3805-3812.

De Zwaan, A. (1983) Carbohydrate catabolism in bivalves. En: *The Mollusca,* vol. 1 (Ed. Hochachka, P.V.), pp. 137-175, Academic Press, New York.

De Zwaan, A. y Mathieu, M. (1992) Cellular biochemistry and endocrinology. En: *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture* (Ed. Gosling, E.), pp. 223-307, Elsevier, Amsterdam.

De Zwaan, A. y Putzer, V. (1985) Metabolic adaptations of intertidal invertebrates to environmental hypoxia. Symp. Soc. Exp. Biol. (Ed. Laverack, M.S.), pp. 33-62, Soc. Exp. Biol. Press, Londres

De Zwaan, A., Cortesi, P., Van Den Thillart, G., Roos, J. y Storey, K.B. (1991) Differential sensitivities to hypoxia by two anoxia-tolerant marine molluscs: a biochemical analysis. *Mar. Biol*., 111, 343-351.

Dekel. N. (2005) Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 234, 19-25.

Dell'Acqua, M.L., Faux, M.C., Thorburn, J., Thorburn, A. y Scott, J.D. (1998) Membrane-targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *EMBO. J*., 17, 2246-2260.

Deming, T.J. (1999) Mussel byssus and biomolecular materials. *Curr. Opin. Chem. Biol*., 3, 100-105.

Depré, C., Rider, M.H. y Hue, L. (1998) mechanisms of control of Herat glycolysis. *Eur. J. Biochem*., 258, 277-290.

Desseyn, J-L., Burton, K.A. y Mcknight, G.S. (2000) Expression of a nonmyristylated variation of the catalytic subunit of protein kinase A during male germ-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 97, 6433-6438.

Dhanasekaran, N. y Premkumar, R.E. (1998) Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene,* 17, 1447-1455.

Díaz-Enrich, M. J., Villamarín, J. A., Ramos-Martínez, J. I. y Ibarguren, I. (2000) Measurement of adenosine 3´, 5´- cyclic monophosphate and guanosine 3´, 5´- cyclic monophosphate in mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) by high-performance liquid chromatography whit diode array detection. *Anal. Biochem*., 285, 105-112.

Díaz-Enrich, M.J., Ibarguren, I, Hellman, U. y Villamarín J.A. (2003) Characterization of a type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Biochem. Biophys*., 416, 19-127.

Diella, F., Cameron, S., Gemund, C., Linding, R., Via, A., Kuster, B., Sicheritz-Ponten, T., Blom, N. y Gibson, T.J. (2004) phospho. ELM: a database of experimentally verified phosphorylation sites in eukaryotic proteins. *BMC. Bioinformatics,* 22, 5-79.

Diller, T.C., Madhusudan, Xuong, N-H. y Taylor, S.S. (2001) Molecular basis for regulatory subunit diversity in cAMP-dependent protein kinase: Crystal structure of the type IIβ regulatory subunit. *Structure*, 9, 73-82.

Diskar, M., Zenn, H-M., Kaupisch, A., Prinz, A. y Herberg, F.W. (2007) Molecular basis for isoform-specific autoregulation of protein kinase A. *Cell. Signal*., 19, 2024-2034.

Døskeland , S.O., Maronde, E. y Gjertsen, B.T. (1993) The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase-functionally different or redundant?. *Biochim. Biophys. Acta*, 1178, 249-258.

Dostmann, W. R. G. y Taylor, S. S. (1991) Identifying the molecular swtches that determine whether (Rp)-cAMPs functions as an antagonist or an agonist in the activation of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 30, 8710-8716.

E

Eisen, J.A., Coyne, R.S., Wu, M., Wu, D., Thiagarajan, M., Wortman, J.R., et al. (2006) Macronuclear genome sequence of the ciliate *Tetrahymena thermophila*, a model eukaryote. *PLoS. Biol.,* 4, e286.

Eisenhardt, D., Fiala, A., Brau, P., Rosenboom, H., Kress, H., Ebert, P.R. y Menzel, R. (2001) Cloning of a catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from the honeybee (Apis mellifera) and its localization in the brain. *Insect Mol. Biol*., 10, 173-181.

England, P.J. (1975) Correlation between contraction and phosphorylation of the inhibitory subunit of troponin in perfused rat heart. *FEBS Lett*., 50, 57-60.

Enomoto, M., Sawano, Y., Kosuge, S., Yamano, Y., Kuroki, K. y Ohtsuki, K. (2006) Hihg phosphorylation of HBV core protein by two alpha-type CK2-activated cAMP-dependent protein kinases in vitro. *FEBS. Lett*., 580, 894-899.

F

Fantozzi, D.A., Harootunian, A.T., Wen, W., Taylor, S.S., Feramisco, J.R., Tsien, R.Y. y Meinkoth, J.L. (1994) Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus. *J. Biol. Chem.*, 269, 2676-2686.

Fauman, E.B. y Saper, M.A. (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends. Biochem. Sci.,* 21, 413-417.

Feng, S.Y., Feng, J.S. y Yamasu, T. (1977) Roles of *Mytilus coruscus* and *Crassostrea gigas* blood cells in defence and nutrition. En: *Comparative pathobiology: invertebrate immune responses,* vol. 3 (Eds. Bulla, L.A. y Cheng, T.C.), pp. 31-67, Plenum, Londres.

Feng, Y. y Walsh, C.A. (2004) The many faces of filamin: a versatile molecular scaffold for cell motility and signalling. *Nat. Cell. Biol.*, 6, 1034-1038.

Fernández, M., Cao, J. y Villamarín, J.A. (1998) In vivo phosphorylation of phosphofructokinase from the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis. Arch. Biochem. Biophys.*, 353, 251-256.

Fernández, M., Cao, J., Vázquez-Illaques, M.D., Ramos-Martínez, J.I. y Villamarín, J.A. (1994) Phosphofructokinase from mantle tissue of *Mytilus galloprovincialis*. Purification and effects of phosphorylation on the enzymatic activity. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 33, 355-364.

Fernández, M., Cao, J., Vega, F.V., Hellman, U., Wernsted, C. y Villamarín, J.A. (1997) cAMP-dependent phosphorylation activates phosphofructokinase from mantle tissue of the mollusc *Mytilus galloprovincialis*. Identification of the phosphorylated site. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 43, 173-181.

Fischer, E.H. (1993) Protein phosphorylation and cellular regulation II. (Nobel Lecture), *Angew. Chem. (Engl.),* 32, 1130-1137.

Fischer, E.H. y Krebs, E.G. (1955) Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J. Biol. Chem.,* 216, 121-132.

Fischer, E.H., Graves, D.J., Crittenden, E.R.S. y Krebs, E.G. (1959) Structure of the site phosphorylated in the phosphorylase b to a reaction. *J. Biol. Chem.,* 234, 1698-1704.

Flockhart, D.A. y Corbin, J.D. (1984) Preparation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. En: *Brain Receptor Methodologies*, *Part. A*, pp. 209-215, Academic Press, Orlando.

Foss, K.B., Landmark, B., Skalhegg, B.S., Taskén, K., Jellum, E., Hansson, V. y Jahnsen, T. (1994) Characterization of in-vitro-translated human regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinases. *Eur: J. Biochem.*, 220, 217-223.

Foster, J.L. y Hall, L.M. (1988) Purification of Drosophila cAMP-dependent protein kinase. *Methods. Enzymol.*, 159, 215-224.

Foster, J.L., Guttman, J.J., Hall, L. y Rosen, O.M. (1984) Drosophila cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*., 259, 13049-13055.

Foster, J.L., Higgins, G.C. y Jackson, F.R. (1988) Cloning, sequence, and expression of the *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit gene. *J. Biol. Chem*., 263, 1676-1688.

Francis, S. H. y Corbin, J. D. (1999) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: Intracellular receptors for cAMP and cGMP action. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*., 36, 275-328.

Francis, S.H. y Corbin, J.D. (1994) Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu. Rev. Physiol*., 56,237-272.

Franco de Oliveira, J.C., Cantisani Borges, A.C., Do Valle Marquez, M. y S., L.G. (1994) Cloning and characterization of the gene for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii. Eur.J. Biochem*., 219, 555-562.

Franco Leis, M. (2006) La miticultura en Galicia: una actividad de éxito y con futuro. *Revista Galega de Economía*, 15, 1-5

Franke, T.F., Yang, S.I, Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R. y Tsichlis, P.N. (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*., 81, 727-736.

Funabara, D., Kinoshita, S., Watabe, S., Siegman, M. J., Butler, T. M. y Harsthorne, D. J. (2001) Phosphorylation of molluscan twitchin by the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 40, 2087-2095.

Funabara, D., Watabe, S., Mooers, S.U., Narayan, S., Dudas, C., Hartshorne, D.J., Siegman, M.J. y Butler, T.M. (2003) Twitchin from molluscan catch muscle: primary structure and relationship between site-specific phosphorylation and mechanical function. *J. Biol. Chem*., 278, 29308-29316.

G

Gabbott, P.A. (1983) Developmental and seasonal changes metabolic activities in marine molluscs. En: *The Mollusca, Environmental Biochemistry and Physiology,* vol. 2 (Ed. Hochachka, P.W.), pp. 165-217, Academic Press., New York.

Gäde, G. (1983) Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. *J. Exp. Zool*., 228, 415-429.

Gamm, D.M., Baude, E.J. y Uhler, M.D. (1996) The major catalytic subunit isoforms of cAMP-dependent protein kinase have distinct biochemical properties *in vitro* and *in vivo. J. Biol. Chem*., 271, 15736-15742.

Gesellchen, F., Bertinetti, O. y Herberg, F.W. (2006) Analysis of posttranslational modifications exemplified using protein kinase A. *Biochim. Biophys. Acta*, 1764, 1788-1800.

Gibbs, C.S. y Zoller, M.J. (1991a) Identification of electrostatic interactions that determine the phosphorylation site specificity of the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 30, 5329-5334.

Gibbs, C.S. y Zoller, M.J. (1991b) Racional scanning mutagenesis of a protein kinase identifies functional regions involved in catalysis and substrate interactions. *J. Biol. Chem*., 266, 8923-8931.

Glikin, G.C., Judewicz, N.D. y Torres, H.N. (1982) Protein kinase activities in *Neurospora crassa*. Molecular properties. *Mol. Cell. Biochem*., 46, 121-127.

Gold, M.G., Barford, D. y Komander, D. (2006) Lining the pockets of kinases and phosphatases. *Curr. Opin. Struct. Biol*., 16, 693-701.

Goldberg, J.M., Manning, G., Liu, A., Fey, P., Pilcher., K.E., Xu, Y. y Smith, J.L. (2006) The dictyostelium kinome--analysis of the protein kinases from a simple model organism. *PLoS. Genet*. 2, e38.

Gomes, S.L., Juliani, M.H., da Costa Maia, J.C. y Rangel-Aldao, R. (1983) Autophosphorylation and rapad dephosphorylation of the cAMP-dependent protein kinase from Blastocladiella emersonii zoospores. *J. Biol. Chem*., 258, 6972-6978.

Gómez, N. y Cohen, P. (1991) Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth activates MAP kinases. *Nature,* 353, 170-173.

Good, M.J., Stommel, E.W. y Stephens, R.E. (1990) Mechanical sensitivity and cell coupling in the ciliated epithelials cells of *Mytilus edulis* gill. *Cell. Tissue. Res*., 259, 51-60.

Gorlin, J.B., et al. (1990) Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *J. Cell. Biol*., 111, 1089-1105.

Götz, C., Koenig M.G., Issinger, O.G. y Montenarh, M. (1995) A casein-kinase-2-related protein kinase is tightly associated with the large T antigen of simian virus 40. *Eur. J. Biochem*., 233, 327-334.

Grant, B.D. y Adams, J.A. (1996) Pre-steady-state kinetic analysis of cAMP-dependent protein kinase using rapid quench flow techniques. *Biochemistry*, 35, 2022-2029.

Green, K. (1995) Mussel adhesive protein. En: *Surgical Adhesives and Sealants. Current Technology and Aplications* (Eds. Sierra, D.H. y Saltz, R.), pp. 19-27. Technomic, Lancaster.

Grieshaber, M.K., Hardewig, I., Kreutzer, U. y Pörtner, H.O. (1994) Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Rev. Physiol. Biochem*., 125, 43-147.

Gross, R.E., Bagchi, S., Lu, X. y Rubin, C.S. (1990) Cloning, characterization, and expression of the gene for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Caenorhabditis elegans* identification of highly conserved and unique isoforms generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem*., 265, 6896-6907.

Gullingsrud, J., Kim, C. y Taylor, S.S. (2006) Dynamic binding of PKA regulatory subunit RIα. *Structure*, 14, 141-149.

Guthrie, C.R., Skalhegg, B.S. y McKnight, G.S. (1997) Two novel brain-specific splice variants of the murine Cβ gene of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*., 272, 29560-29565.

H

Han, J-D., Baker, N.E. y Rubin, Ch.S. (1997) Molecular characterization of a novel a Kinase anchor protein from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem*., 272, 26611-26619.

Hanks, S. y Hunter, T. (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*., 9, 576-596.

Hanks, S.K. y Quinn, A.M. (1991) Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods. Enzymol*., 200, 38-62.

Hanks, S.K., Quinn, A.M. y Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science,* 241, 42-52.

Hansson, V.V., Skalhegg, B.S. y Tasken, K. (2000) Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol*., 73, 81-92.

Hantschel, O., Nagar, B., Guettler, S., Kretzschmar, J., Dorey, K., Kuriyan, J. y Superti-Furga, G. (2003) A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-abl. *Cell*., 112, 845-857.

Haq, E., Sharma, S. y Khuller, G.K. (2000) Purification and characterization of cAMP dependent protein kinase from *Microsporum gypseum. Biochim. Biophys. Acta*, 1474, 100-106.

Haracska, L. y Udvardy, A. (1992) Purification and characterization of the catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase from *Drosophila melanogaster. Insect. Biochem. Molec. Biol*., 22, 851-852.

Harrison, R.A. (2004) Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar agent bicarbonate. *Mol. Reprod. Dev*., 67, 337-352.

Hausken, Z.E., Coghlan, V.M., Schafer Hastings, C.A., Reimann, E.M. y Scott, J.D. (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, 24245-24251.

Hausken, Z.E., Dell'Acqua, M.L., Coghlan, V.M. y Scott, J.D. (1996) Mutational analysis of the A-kinase anchoring protein (AKAP)-binding site on RII. *J. Biol. Chem.*, 271, 29016-29022.

Heller, W.T., Vigil, D., Brown, S., Blumenthal, D.K., Taylor, S.S. y Trewhella, J. (2004) C subunits binding to the protein kinase A RIα dimmer induce a large conformational change. *J. Biol. Chem.*, 279, 19084-19090.

Hellman, U. y Bhikhabhai, R. (2002) Easy amino acid sequencing of sulfonated peptides using post-source decay on a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer equipped with a variable voltage reflector. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, 16, 1851-1859.

Hellman, U., Wernstedt, C., Gomez, J. y Heldin, C.H. (1995) Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal. Biochem.*, 224, 451-455.

Hemmings, B.A., Aitken, A., Cohen, P., Rymond, M. y Hofmann, F. (1982) Phosphorylation of the type-II regulatory subunit of cyclic-AMP-dependen protein kinase by glycogen synthase kinase 3 and glycogen synthase kinase 5. *Eur. J. Biochem.*, 127, 473-481.

Herberg, F. W., Dostmann, W. R. G., Zorn, M., Davis, S. J. y Taylor, S. S (1994) Crosstal between domains in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase: influence of amino terminus on cAMP binding and holoenzime formation. *Biochemistry*, 33, 7485-7494.

Herberg, F.W., Bell, S.M. y Taylor, S.S. (1993) Expression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in Escherichia coli: multiple isozymes reflect different phosphorylation states. *Prot. Eng.*, 6, 771-777.

Herberg, F.W., Doyle, M.L., Cox, S. y Taylor, S.S. (1999) Dissection of the nucleotide and metal phosphate binding sites in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 38, 6352-6360.

Herberg, F.W., Taylor, S.S. y Dostmann, W.R. (1996) Active site mutations define the pathway for the cooperative activation of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 35, 2934-2942.

Herberg, F.W., Zimmermam, B., McGlone, M. y Taylor, S.S. (1997) Importance of the a-helix of the catalytic subunit of camp-dependent protein kinase for stability and for orienting subdomains at the clef interface. *Protein Sci.*, 6, 569-579.

Hill, R.B. & Welsh, J.H. (1966) Heart, circulation, and blood cells. *En Psysiology of Mollusca*. (Eds. K.M. Wilbur y C.M. Younge), pp. 126-174, Academic Press, New York.

Hixson, C.S. y Krebs, E.G. (1980) Characterization of a cyclic AMP-binding protein from bakers' yeast. Identification as a regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 255, 2137-2145.

Hock, R.S. y Condeelis, J.S. (1987) Isolation of a 240-kilodalton actin-binding protein from *Dictyostelium discoideum. J. Biol. Chem.*, 262, 394-400.

Hofmannn, F., Beavo, J.A., Bechtel, P.J. y Krebs, E.G. (1975) Comparison of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal and bovine heart muscle. *J. Biol. Chem.*, 19, 7795-7801.

Holden, C. P. y Story, K. B. (1998) Protein kinase A from bat skeletal muscle: A kinetic study of the enzyme from a hibernating mammal. *Arch. Biochem. Biophys.*, 358, 243-250.

Hoppe, J., Freist, W., Marutzky, R. y Shaltiel, S. (1978) Mapping the ATP-binding site in the catalytic subunit of adenosine-3-monophosphate-dependent protein kinase. Spatial relationship with the ATP site of the undissociated enzyme. *Eur. J. Biochem.*, 90, 427-432.

Hotz, A., König, N., Kretschmer, J., Maier, G., Ponsting, H. y Kinzel, V. (1989b) A sequence variant in the N-terminal region of the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.*, 256, 115-117.

Hotz, A., König, N., Taniguchi, H., Chrivia, J.C. y Kinzel. V. (1989a) Catalyitc subunit of cAMP-dependent protein kinase from bovine heart: several isoforms demonstrated by high resolution focusing in immobilized pH gradient. *Biochem.Biophys. Commun.*, 160, 596-601.

Huang, H.D., Lee, T.Y., Tseng, S.W. y Horng, J.T. (2005) "KinasePhos: a web tool for identifying protein kinase-specific phosphorylation sites" *Nucleic Acids Research*, 33, 226-229.

Huang, L. L-s. y Taylor, S.S. (1998) Dissecting cAMP binding domain A in the RIα subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 273, 26739-26746.

Huang, L.J-S., Durick, K., Weiner, J.A., Chun, J. Y Taylor, S.S. (1997a) Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds type I and type II regulatory subunits. *J. Biol. Chem.*, 272, 8057-8064.

Huang, L.J-S., Durick, K., Weiner, J.A., Chun, J. y Taylor, S.S. (1997b) D-AKAP2, a novel protein kinase A anchoring protein with a putative RGS domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94, 11184-11189.

Humphries, K. y Taylor, S. (2004) Oxidation dependent dephosphorylation of cAMP dependent protein kinase. *FASEB J.*, 18, c19.

Humphries, K.M., Juliano, C. y Taylor, S.S. (2002) regulation of cAMP-dependent protein kinase activite by glutathionylation. *J. Biol. Chem.*, 227, 43505-43511.

Hunter, T. (1987) A thousand and one protein kinases. *Cell*, 50, 823-829.

Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yan of protein phosphorylation and signalling. *Cell.,* 80, 225-236.

Hunter, T. y Sefton, B.M. (1980) Transforming gene product of rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,* 77, 1311-1315.

Hunter, T. y Sefton, B.M., Eds. (1991a) Protein phosphorylation, part A (protein kinases: Assays, purification, antibodies, functional análisis, cloning, and expression). Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego.

Hunter, T. y Sefton, B.M., Eds. (1991b) Protein phosphorylation, part B (Analysis of protein phosphorylation, protein kinase inhibitors, and protein phosphatases). Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego.

Huse, M. y Kuriyan, J. (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell.*, 109, 275-282.

I

Ibarguren, I., Vázquez-Illanes, M.D. y Ramos-Martínez, J.I. (1990) Seasonal variations in glycolisis in *Mytilus galloprovincialis* LmK. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97B, 279-283.

Iglesias, J.I.P., Navarro, E., Alvarez, J.P. y Armentia, I. (1993) Feeding, particle selection and absorption on cockles *Cerastoderma edule* (L.) exposed to variable conditions of food concentrations and quality. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 162, 177-198.

Iltzsch, M.H. y Mansur, T.E. (1987) Partial purification and characterization of cAMP-dependent protein kinase from *Fasciola hepatica. Mol. Biochem. Parasitol.,* 23, 265-274.

Inaba, K., Kagami, O. y Ogawa, K. (1999) Tctex2-related outer arm dynein light Caín is phosphorylated at activation of sperm motility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 256, 177-183.

Inoue, H. y Yoshioka, T. (1997) Purification of a regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from *Drosophila* heads. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235, 223-226.

Ishii, N., Simpson, A.W.M. y Ashley, C.C. (1989) Free calcium at rest during «catch» in single smooth muscle cells. *Science*, 243, 1367-1368.

Itoh, A., Inaba, K., Ohtake, H., Fujinoki, M. y Morisawa, M. (2003) Characterization of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from rainbow trout spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 855-861.

Iyer, G.H., Moore, M.J. y Taylor, S.S. (2005) Consequences of Lysine 72 Mutation on the phosphorylation and activation state of cAMP-dependent kinase. *J. Biol. Chem.*, 280, 8800-8807.

J

Jahnsen, T., Hedin, L., Kidd, V.J., Beattie, W.G., Lohmann, S.M., Walter,U., Durica, J., Schulz, T.Z., Browener, M., Lawrence, C.B., Goldman, D., Ratoosh, S.L. y Richards, J.S. (1986) Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type IIβ cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. *J. Biol. Chem.*, 261, 12352-12361.

Jahnsen, T., Lohmann, S.M., Walter, U., Hedin, L. y Richards, J.S. (1985) Purification and characterization of hormone-regulated isoforms of the regulatory subunit of type IIβ cAMP-dependent protein kinase from rat ovaries. *J. Biol. Chem.*, 260, 15980-15987.

Jedrzejewski, P.T., Girod, A., Tholey, A., König, N., Thullner, S., Kinzel, V. y Bossemeyer, D. (1998) A conserved deamidation site at Asn 2 in the catalytic subunit of mammalian cAMP-dependent protein kinase detected by capillary LC-MS and tandem mass spectrometry. *Protein Sci.*, 7, 457-469.

Johannessen, M. y Moens, U. (2007) Multisite phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) by a diversity of protein kinases. *Front. Biosci*., 12, 1418-1432.

Johnson, L.N. (1994) Control by protein phosphorylation. *Nat. Struct. Biol.*, 1, 657-659.

Johnson, L.N. y Barford, D. (1993) The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 22, 199-232.

Johnson, L.N. y Barford, D. (1994) Electrostatic effects in the control of glycogen phosphorylase by phosphorylation. *Protein Sci.,* 3, 1726-1730.

Johnson, L.N., Noble, M.E.M. y Owen, D.J. (1996) Active and inactive protein kinases: structural bassis for regulation. *Cell.*, 85, 149-158.

Johnson, L.R., Foster, J.A., Haig-Ladewig, L., VanScoy, H., Rubin, C.S., Moss, S.B. y Gerton, G.L. (1997) Assembly of AKAP82, a protein kinase A anchor protein, into the fibrous sheath of mouse sperm**.** *Dev. Biol*., 192, 340-350.

Jorgensen, C.B. (1989) Water processing in ciliary feeders, with special reference to the bivalve filter pump. *Comp. Biochem. Physiol*., 94A(2), 383-394.

Jung, S., Hoffmann, R., Rodriguez, P.H., Mutzel, R.y Hofer, H.W. (1995) The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from *Ascaris suum* the cloning and structure of a novel subtype of protein kinase A. *Eur. J. Biochem.,* 232, 111-117.

K

Kalderon, D. y Rubin, G.M. (1988) Isolation and characterization of *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase genes. *Genes. Dev*., 2, 1539-1556.

Kannan, N., Haste, N., Taylor, S.S. y Neuwald, A.F. (2007) The hallmark of AGC kinase functional divergence is its C-terminal tail, a cis-acting regulatory module. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 104, 1272-1277.

Kasuga, M., Karlsson, F.A. y Kahan, C.R. (1982) Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science,* 215, 185-187.

Kemp, B.E. y Pearson, R.B. (1991) Design and use of peptide substrates for protein kinases. *Methods. Enzymol*., 200, 121-134.

Kemp, B.E., Benjamini, E. y Krebs, E.G. (1976) Synthetic hexapeptide sustrates and inhibitors of 3′:5′-cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 73, 1038-1042.

Kemp, B.E., Parquer, M.W., Hu, S., Tiganis, T. y House, C. (1994) Substrate and pseudosubstrate interactions with protein kinases: determinants of specificity. *Trends. Biochem. Sci.,* 19, 440-444.

Kerlavage, A.R. y Taylor, S.S. (1980) Covalent modification of an adenosine 3′:5′-monophosphate binding site of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II with 8-azidoadenosine 3′:5′-monophosphate. *J. Biol. Chem*., 255, 8483-8488.

Kim, C., Vigil, D., Anand, G. y Taylor, S.S. (2006) Structure and dynamics of PKA signaling proteins. *Eur. J. Cell. Biol*., 85, 651-654.

Kim, C., Xuong, N.H. y Taylor, S.S. (2005) Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. *Science*, 307, 690-696.

Kinzel, V., et al., y Shaltiel, S. (1987) Chromatographic separation of two heterogeneous forms of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase holoenzyme type I and tipe II from striated muscle of different mammalian species. *Arch. Biochem. Biophys*., 253, 341-349.

Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. y Nisdhizuka, Y. (1980) Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem*., 255, 2273-2276.

Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Xuong, N.H., Taylor, S.S. y Sowadski, J.M. (1991b) Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science,* 253, 414-420.

Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F.,Asford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S. y Sowadski, J.M. (1991a). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science,* 253, 407-414.

Kong, C.T. y Cook, P.F. (1988) Isotope partitioning in the adenosine 3′,5′-monophosphate dependent protein kinase reaction indicates a steady-state ramdon kinetic mechanism. *Biochemistry*, 27, 4795-4799.

Kornev, A., Haste, N.M., Taylor, S.S. y Ten Eyck, L.F. (2006) Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 17783-17788.

Kosuge, S., Sawano, Y. y Ohtsuki, K. (2003) A novel CK2-mediated activation of type II cAMP-dependent protein kinase through specific phosphorylation of its regulatory subunit (R II alpha) in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310, 163-168.

Kovo, M., Kandli-Cohen, M., Ben-Him, M., Galiani, D., Carr, D.W. y Dekel, N. (2006) An active protein kinase A (PKA) is involved in meiotic arrest of rat growing oocytes. *Reproduction*, 132, 33-44.

Krebs, E.G. (1993) Novel Lecture. Protein phosphorylation and cellular regulation I. *Biosci. Rep.*, 13, 127-142.

Krebs, E.G. y Fischer, E.H. (1956) The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta,* 20, 150-157.

Krebs, E.G., Huston, R.B. y Hunkeler, F.L. (1968) Properties of phosphorylase kinase and its control in skeletal muscle. *Adv. Enzyme Regul.*, 6, 245-255.

Krebs, E.G., y Fischer, E.H. (1955) Phosphorylase activity of skeletal muscle extracts. *J. Biol. Chem.*, 216, 113-120.

Kreegipuu, A., Blom, N., Brunak, S. y Järv, J. (1998) Statistical analysis of protein kinase specificity determinants. *FEBS Letters*, 430, 45-50.

L

Langeberg, L.K. y Scott, J.D. (2005) A-kinase-anchoring proteins. *J. Cell. Sci.*, 118, 3217-3220.

Le Pennec, M., Barillé, L. y Grizel, H. (2003a) The gills. En: *Atlas d'histologie et de cytology des mollusques bivalves marins* (Ed. Grizel, H.), pp. 35-52, Ifremer, Plouzané.

Le Pennec, M., Grizel, H. y Barillé, L. y (2003b) The labial palps. En: *Atlas d'histologie et de cytology des mollusques bivalves marins* (Ed. Grizel, H.), pp. 53-64, Ifremer, Plouzané.

Lee, H., Scherer, N.F. y Messersmith, P.B. (2006) Single-molecule mechanics of mussel adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 12999-13003.

Lenoir, F., Robbins, I., Mathieu, M., Lubet, P. y Gabbott, P.A. (1989) Isolation, characterization and glucose metabolism of glycogen cells from the labial palps of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 101, 495-501.

León, D.A., Herberg, F.W., Banky, P. y Taylor, S.S. (1997) A stable α-helical domain at the N terminus of the RIα subunits of cAMP-dependent protein kinase is a novel dimerization/docking motil. *J. Biol. Chem.*, 272, 28431-28437.

Levy, F.O., Oyen, O., Sandberg, M., Taskén, K., Eskild, W., Hansson, V. y Jahnsen, T. (1988) Molecular cloning, complementary deoxyribonucletic acid structure and predicted full-length amino-acid sequence of the hormone inducible regulatory subunit of 3′-5′-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase from human testis. *Mol. Endocrinol*., 2, 1364-1373.

Lew, J., Taylor, S.S. y Adams, J.A. (1997) Identification of a partially rate-determining step in the catalytic mechanism of cAMP-dependent protein kinase: a transient kinetic study using stopped-flow fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, 36, 6717-6724.

Li, F., Gangal, M., Juliano, C., Gorfrain, E., Taylor, S.S. y Johnson, D.A. (2002) Evidence for an internal entropy contribution to phosphoryl transfer: a study of domain closure, backbone flexibility, and the catalytic cycle of cAMP-dependent protein kinase. *J. Mol. Biol*., 315, 459-469.

Li, Y. y Rubin, C.S. (1995) Mutagenesis of the regulatory subunit (RIIβ) of cAMP-dependent protein kinase IIβ reveals hydrophobic amino acids that are essential for RIIβ dimerization and/or anchoring RIIβ to the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*, 270, 1935-1944.

Li, Z., Rossi, E.A., Hoheisel, J.D., Kalderon, D. y Rubin, C.S. (1999) Generation of a novel A kinase anchor protein and a myristoylated alanine-rich C kinase substrate-like analog from a single gene. *J. Biol. Chem*., 274, 27191-27200.

Liauw, S. y Steinberg, R.A. (1996) dephosphorylation of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase at Thr-197 by a cellular protein phosphatase and by purified protein phosphatase-2A. *J. Biol. Chem.*, 271, 258-263.

Lindberg, R.A., Quinn, A.M. Hunter, T. (1992) Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do?. *Trends. Biochem. Sci*., 17, 114-119.

Liu, J., Farmer, J.D.Jr., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I. y Schreiber, S.L. (1991) Calcineurin is a cammon target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*., 66, 807-815.

Liu, J., Hu, JY., Schacher, S. y Schwartz JH. (2004) The two regulatory subunits of *aplysia* cAMP-dependent protein kinase mediate distinct functions in producing synaptic plasticity. *J. Neurosci*, 24, 2465-2474.

Locatelli, F., LaFourcade, C., Maldonado, H. y Romano, A. (2001) Characterisation of cAMP-dependent protein kinase isoforms in the brain of the crab *chosmagnathus*. *J. Comp. Physiol*., B 171, 33-40.

Lohmann, S.M., DeCamilli, P., Einig, I. y Walter, U. (1984) High-affinity binding of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase to microtubule-associated and other cellular proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 81, 6723-6727.

Lowy, J. y Millman, B.M. (1963) The contractile mechanism of the anterior byssus retractor of *Mytilus edulis*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*., 246, 105-148.

Lu, X., Gross, R.E., Bagchi, S. y Rubin, C.S. (1990) Cloning, structure, and expression of the gene for a novel regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 265, 3293-3303.

Lubet, P. (1959) Recherches sur le cycle sexual et l'émission des gametes chez les Mytilidés et las Pectinidés. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Marit.*, 23, 389-545.

Luconi, M., Carloni, V., Marra, F., Ferruzzi, P., Forti, G. y Baldi, E. (2004) Increased phosphorylation of AKAP by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances human sperm motility through tail recruitment of protein kinase A. *J. Cell. Sci*., 117, 1235-1246.

Lutz, R.A. y Kennish, M.J. (1992) Ecology and morphology of larval and early postlarval mussels. En: *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture* (Ed. Gosling, E.), pp. 53-86, Elsevier, Amsterdam.

M

MacDonald, J.A. y Story, K.B. (1998) cAMP-dependent protein kinase from brown adipose tissue: temperature effects on kinetic properties and enzyme role in hibernating ground squirrels. *J. Comp. Physiol. B*., 168, 513-525.

Madhusudan, Akamine, P., Xuong, N.H. y Taylor, S.S. (2002) Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Nature Struct. Biol*., 9, 273-277.

Magge, T y Seabra, M.C. (2005) Fatty acylation and prenylation of proteins: what's hot in fat. *Curr. Opin. Cell. Biol*., 17, 190-196.

Makman, M., y Stefano, G.B. (1984) Marine mussels and cephalopods as models for study of neuronal aging. En: *Invertebrate Models in Aging Research* (Eds. Mitchell, D.H. y Johnson, T.E.), pp. 165-190, CRC Press, Boca Raton, Florida,

Maldonado, F. y Hanks, S.K. (1988) A cDNA clone encoding human cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Cα. *Nucleic Acids. Res*., 16, 8189-8190.

Man, S., Yonemoto, W.M., Taylor, S.S. y Firtel, R.A. (1992) DdPK3, which plays essential roles during *Dictyostelium* development, encodes the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 89, 10701-10705.

Mane, S. D., Darville, R. G., Sauer, J. R. Essenberg, R. C. (1985) Cyclic AMP-dependent protein kinase from salivary glands of the tick, *Amblyomma americanun*. *Insect. Biochem*., 15, 777-787.

Manning, G. Genomic overview of protein kinases (December 13, 2005), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, Wormbook, doi/10.1895/wormbook.1.60.1, http://www.wormbook.org.

Manning, G., Plowman, G.D., Hunter, T. y Sudarsanam, S. (2002) Evolution of protein kinase signalling from yeast to man. *Trends. Biochem. Sci*., 27, 514-520.

Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. y Sudarsanam, S. (2002) the protein kinase complement of the human genome. *Science,* 298, 1919-1934.

Marhall, C.J. (1994) MAP kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev*., 4, 82-89.

Massa, J.S., Fellows, R.E. y Maurer, R.A. (1990) Rat RIIβ isoform of type I regulatory subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase: cDNA sequence analysis, mRNA tissue specificity, and rat/mouse difference in expression in testis. *Mol. Reprod. Deve*., 26, 129-133.

McConnachie, G., Langeberg, L.K. y Scott, J.D. (2006) AKAP signalling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends. Mol. Med.*, 12, 317-323.

Mehrani, H. y Story, K.B. (1995) cAMP-dependent protein kinase and anoxia survival in turtles: purification and properties of liver PKA. *Mol. Cell. Biochem*., 145, 81-88.

Michaelidis, B. y Storey, K.B. (1990b) Anaerobiosis and the regulation of glycolytic enzymes in the sea anemone *Metridium senile*. *J. Exp. Zool*., 256, 154-161.

Michaelidis, B. y Storey, K.B. (1991) Evidence for phosphorylation/dephosphorylation control of phosphofructokinase from organs of the anoxia-tolerant sea mussel *Mytilus edulis*. *J. Exp. Zool*., 257, 1-9.

Mikhailov, A.T., Torrado, M., Méndez, J. y López, M.J. (1996) Annual cycle of expresión of the connective tissue polypeptide markers in the mantle of the mussel, *Mytilus galloprovincialis Lmk. Mar. Biol*. (Berlin), 126, 77-90.

Miki, K., Willis, W.D., Brown, P.R., Goulding, E.H. y Eddy, E.M. (2002) Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev. Biol*., 15, 331-342.

Mitchinson, A. (2006) Mussel muscle (Biochemistry News & Views) *Nature*, 442, 877.

Moore, M.J., Kanter, J.R., Jones, K.C. y Taylor, S.S. (2002) Phosphorylation of the catalytic subunit of protein kinase A. *J. Biol. Chem*., 277, 47878-47884.

Moore, M.N. y Gelder, S.R. (1985) Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Trans. Am. Microsc. Soc*., 104, 242-249.

Moore, M.N. y Lowe, D.M. (1977) The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *J. Invertebr. Pathol*., 29, 18-30.

Morikis, D., Roy, M., Newlon, M.G., Scott, J.D. y Jennings, P.A. (2002) Electrostatic properties of the structure of the docking and dimerization of protein kinase A IIα. *Eur. J. Biochem*., 269, 2040-2051.

Morisawa, M. y Okumo, M. (1982) Cyclic AMP induces maturation of trout sperm axoneme to initiate motility. *Nature*, 295, 703-704.

Morton, B. (1983) Feeding and digestión in Bivalvia. En: *The Mollusca,* vol. 5 (Eds. Saleuddin A.S.M. y Wilbur, K.M.), pp. 65-147, Academic Press, New York.

Morton, B. (1992) The evolution and success of the heteromyarian form in the mytiloida. En: *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture* (Ed. Gosling, E.), pp. 21-52, Elsevier, Amsterdam

Muniyappa, K., Leibach, F.H. y Mendicio, J. (1983) characterization and comparison of the soluble and membrana-bound cyclic AMP-dependent protein kinase from swine kidney. *Mol. Cell. Biochem*., 50, 157-171.

Mustelin, T. (2006) A brief introduction to the protein phosphatase families. *Methods. Mol. Biol*., 365, 9-22.

N

Nagar, B., Hantschel, O., Young, M.A., Scheffzek, K., Veach, D., Bomman, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G. y Kuriyan, J. (2003) Structural basis for the autoinhibition of c-abl tyrosine kinase. *Cell*., 112, 859-871.

Nappi, A.J. y Ottaviani, E. (2000) Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays*, 22, 469-480.

Narain, A.S. (1973) The amoebocytes of lamellibranch molluscs with special reference to the circulating amoebocytes. *Malacol. Rev*., 6, 1-12.

Narain, A.S. (1976) A review of the structure of the heart of molluscs, particularly bivalves, in relation to cardiac function. *J. Mollus. Stud*., 42, 46-62.

Narayana, N., Cox, S., Shaltiel, S., Taylor, S.S. y Xuong, N. (1997a) Cristal structure of a polyhistideine-tagged recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with the peptide inhibor PKI (5-24) and aenosne. *Biochemistry*, 36, 4438-4448.

Narayana, N., Cox, S., Xuong, N-h., Ten Eyck, L.F. y Taylor, S.S. (1997b) A binary complex of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase and adenosine further defines conformational flexibility. *Structure*, 5, 921-935.

Narayana, N., Diller, T.C., Koide, K., Bunnage, M.E., Nicolaou, K.C., Brunton, L.L., Xuong, N.H., Ten Eyck, L.F. y Taylor, S.S. (1999) Cristal structure of the potent natural product inhibitor balanol in complex with the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 38, 2367-2376.

Newlon, M.G., Roy, M., Hausken, Z.E., Scott, J.D. y Jennings, P.A. (1997) The A-kinase anchoring domain of type IIα cAMP-dependent protein kinase is highly helical. *J. Biol. Chem.*, 272, 23637-23644.

Newlon, M.G., Roy, M., Morikis, D., Carr, D.W., Westphal, R., Scott, J.D. y Jennings, P.A. (2001) A novel mechanism of PKA anchoring revealed by solution structures of anchoring complexes. *EMBO. J.*, 20, 1651-1662.

Newlon, M.G., Roy, M., Morikis, D., Hausken, Z.E., Coghlan, V., Scott, J.D. y Jennings, P.A. (1999) The molecular basic for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR. *Nat. Struct. Biol.*, 6, 222-227.

Niedner, R.H., Buzko, O.V., Haste, N.M., Taylor, A., Gribskov, M. y Taylor, S.S. (2006) Protein Kinase resource: an integrated environment for phosphorylation research. *Proteins,* 63, 78-86.

Nolan, M.A., Babcock, D.F., Wennemuth, G., Browm, W., Burton, K.A. y McKnight, G.S. (2004) Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit $C\alpha_2$ orchestrates cAMP signalling for male fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 101, 13483-13488.*

Novas, A., Cao, A., Barcia, R. y Ramos-Martinez, J.I. (2004) Nitric oxide release by hemocytes of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk was provoked by interleukin-2 but not by lipopolysaccharide. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 36, 390-394.

O

Obenauer, J.C., Cantley, L.C. y Yaffe, M.B. (2003) Scansite 2.0: proteome-wide prediction of cell signalling interactions using short sequence motifs. *Nucleic. Acids. Res.*, 31, 3635-3641.

Ochatt, C.M., Ulloa, R.T., Torres, H.N. y Tellez-Iñón, M.T. (1993) Characterization of the catalytic of *Trypanosoma cruzi* AMP-dependent protein kinase. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 57, 73-82.

Ogreid, D. y Doskeland, S.O. (1983) Cyclic nucleotides modulate the release of [3H] adenosine cyclic 3',5'-phosphate bound to the regulatory moiety of protein kinase I by the catalytic subunit of the kinase. *Biochemistry*, 22, 1686-1696.

Ogreid, D., Ekanger, R., Suva, R.H., Miller, J.P. y Doskeland, S.O. (1989) Comparison of the two classes of binding sites (A and B) of type I and Type II cyclic-AMP-dependent protein kinases by using cyclic nucleotide analogs. *Eur. J. Biochem*., 181, 19-31.

Olah, G.A., Mitchell, R.D., Sosnick, T.R., Walsh, D.A. y Trewhella, J. (1993) Solution structure of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit and its contraction upon binding the protein kinase inhibitor peptide. *Biochemistry*, 32, 3649-3657.

Olsen, S.R. y Uhler, M.D. (1989) Affinity purification of the Cα and Cβ isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*., 264, 18662-18666.

Orstavik, S., Reinton, N., Frengen, E., Langeland, B.T., Jahnsen, T. y Skalhegg, B.S. (2001) Identification of novel splice variants of the human catalytic cubunit cβ of cAMP-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem*., 268, 5066-5073.

Oyen, O., Myklebust, F., Scott, J.D., Cadd, G.G., McKnight, G.S., Hansson, V. y Jahnsen, T. (1990) Subunits of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase show differential and distinct expression patterns during germ cell differentiation: alternative polyadenylation in germ cells gives rise to unique smaller-sized mRNA species. *Biol. Reprod*., 43, 46-54.

Oyen, O., Myklebust, F., Scott, J.D., Hansson, V. y Jahnsen, T. (1989) Human testis cDNA for the regulatory subunit RII of cAMP-dependent protein kinase encodes an alternate amino-terminal region. *FEBS Lett*., 246, 57-64.

P

Palmer, M.J., McSwain, J.L., Spatz, M.D., Tucker, J.S., Essenberg, R.C. y Sauer, J.R. (1999) Molecular cloning of cAMP-dependent protein kinase catalytic cubunit isoforms from the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.). *Insect. Biochem. Mol. Biol*., 29, 43-51.

Panchal, R.G., Cheyley, S. y Bayley, H. (1994) Differential phosphorylation of neuronal substrates by catalytic subunits of *Aplysia* cAMP-dependent protein kinase with alternative N termini. *J. Biol. Chem*., 269, 23722-23730.

Paparo, A. (1992) Innervation of the lateral cilia in the mussel, *Mytilus edulis* L. *Biol. Bull*., 143, 592-604.

Park, S.K., Sedore, S.A., Cronmiller, C. y Hirsh. J. (2000) Type II cAMP-dependent protein kinase-deficient *Drosophila* are viable but show developmental, circadian, and drug response phenotypes. *J. Biol. Chem*., 275, 20588-20596.

Pastori, R., Moreno, S. y Passeron, S. (1985) Polymeric structure of the cyclic AMP-dependent protein kinase from the dimorphic fungus *Mucor rouxii. Arch. Biochem. Biophys*., 199, 321-330.

Pawson, T. y Scott, J.D. (1997) Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science,* 278, 2075-2080.

Pawson, T. y Scott, J.D. (2005) Protein phosphorylation in signalling—50 years and counting. *Trends Biochem. Sci*., 30, 286-290.

Pearson, R.B. y Kemp, B.E. (1991) Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations. *Methods. Enzimol*., 200, 62-81.

Peek, K. y Gabbott, P.A. (1989) adipogranular cells from the mantle tissue of *Mytilus edulis* L. I. Isolation, purification and biochemical characteristics of dispersed cells. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*., 126, 203-216.

PeeK, K., Gabbatt, P.A. y Runham, N.W. (1989) Adipogranular cells from the mantle tissue of *Mytilus edulis* L. II. Seasonal changes in the distribution of dispersed cells in a performed percoll density gradient. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*., 126, 217-230.

Pellicena, P. y Kuriyan, J. (2006) Protein-protein interaction in the allosteric regulation of protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol*., 16, 702-709.

Pepperkok, R., Hotz-Wagenblat, A., König, N., Girod, A., Bossemeyer, D. y Kinzel, V.(2000) Intracellular distribution of mammalian protein kinase A catalytic subunit altered by conserved Asn2 deamidation. *J. Cell. Biol*., 148, 715-726.

Peters, K.A., Demille, J.G. y Fischer, E.H. (1977) Adenosine 3′:5′-monophosphate dependent protein kinase from bovine heart. Characterization of the catalytic subunit. *Biochemistry,* 16, 5691-5697.

Pfister, T.D. y Story, K.B. (2002) Protein kinase A: purification and characterization of the enzyme from two cold-hardy goldenrod gall insects. *Insect. Biochem. Mol. Biol*., 32, 505-515.

Pinna, L.A. (2002) Protein kinase CK2 a challenge to canons. *J. Cell. Sci*., 115, 3873-3878.

Pinna, L.A. y Ruzzene, M. (1996) How do protein kinases recognize their substrates?. *Biochim. Biophys. Acta*, 1314, 191-225.

Pipe, R.K. (1987a) Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Biol*., 96, 519-528.

Pirie, B.J.S. y George, S.G. (1979) Ultrastructure of the heart and excretory system of *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K*., 59, 819-829.

Popowicz, G.M., Schleicher, M., Noegel, A.A. y Holak, T.A. (2006) Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton. *Trends. Biochem. Sci*., 31, 411-419.

Purchon, R.D. (1987a) The stomach in the Bivalvia. Philos. *Trans. R. Soc. Lond., Ser. B*., 316, 183-276.

Q

Qin, X-X. y Waite, J.H. (1995) Exotic collagen gradients in the byssus of the mussel *Mytilus edulis. J. Exp. Biol*., 198, 633-644.

Qin, X-X. y Waite, J.H. (1998) A potential mediator of collagenous block copolymer gradients in mussel byssal threads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 95, 10517-10522.

R

Ramaiah, A. (1974) Pasteur effect and phosphofructokinase. *Curr. Top. Cell. Regul*., 8, 297-345.

Rangel-Aldo, R. y Rosen, O.M. (1977) Effect of cAMP and ATP on the reassciation of phosphorylated and monphosphorylated subunits of the cAMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J. Biol. Chem*., 252, 7140-7145.

Rannels, S.R. y Corbin, J.D. (1980) Two different intrachain cAMP binding sites of cAMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem*., 255, 7085-7088.

Rannels, S.R., Beasly, A. y Corbin, J.D. (1983) Regulatory subunits of bovine heart and rabbit skeletal muscle cAMP-dependent protein kinase isozymes. *Methods. Enzymol*, 99, 55-62.

Rao, Y., Fischer, Q.S., Yang, Y., McKnight, G.S., LaRue, A. y Daw, N.W. (2004) Reduced ocular dominance plasticity and long-term potentiation in the developing visual cortex of protein kinase A RII alpha mutant mice. *Eur. J. Neurosci*, 20, 837-842.

Ray, L.B. y Sturgill, T.W. (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 84, 1502-1506

Reimann, E.M. (1986) Conversion of bovine cardiac adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase to a heterodimer by removal of 45 residues at the N-terminus of the regulatory subunit. *Biochemistry*, 25, 119-125.

Reimann, E.M. y Beham, R.A. (1983) Catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Methods. Enzimol*., 99, 51-55.

Reinton, N., Haugen, T.B., Orstavik, S., Skalhegg, B.S., Hansson, V., Jahnsen, T.y Taskén, T. y.(1998) The gene encoding the Cγ catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase is a transcribed retropson. *Genomics*., 49, 290-297.

Reinton, N., Orstavik, S., Haugen, T.B., Jahnsen, T., Taskén, T. y Skalhegg, B.S.(2000) A novel isoforma of human cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase, Cα-s, localizes to sperm midpice. *Biol. Reprod.*, 63, 607-611.

Robertson, S.P. (2005) Filamin A: phenotypic diversity. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 15, 301-307.

Robinson, G.A., Butcher, R.W. y Sutherland, E.W. eds. (1971) *Cyclic AMP*. Academic Press, Londres.

Robinson-Steiner, A.M., Beebe, S.J., Rannels, S.R. y Corbin, J.D. (1984) Microheterogeneity of type II cAMP-dependent protein kinase in various mammalian species and tissues. *J. Biol. Chem.*, 259, 10596-10605.

Rodríguez, J.L., Barcia, R., Ramos-Martínez, J.I. Villamarín, J.A. (1998) Purification of a novel isoform of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 359, 57-62.

Roher, N., Miro, F., Boldyreff, B., Llorens, F., Plana, M., Issinger, O.G. y Itarte, E. (2001) The C-terminal domain of human grp94 protects the catalytic subunit of protein kinase CK2 (CK2 alpha) against thermal aggregation. Role of disulfide bonds. *Eur. J. Biochem.*, 268, 429-436.

Ruddell, C.L. (1971) The fine structure of oyster agranular amoebocytes from regenerating mantle wounds in the pacific oyster, *Crassostrea gigas. J. Invertebr. Pathol.*, 18, 260-268.

Ruegg, J.C. (1971) Smooth muscle tone. *Physiol. Rev.*, 51, 201-248.

S

Sadowski, I., Stome, J.C. y Pawson, T. (1986) A moncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase fuction and transforming activity of fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 4396-4408.

San Agustin, J.T., Leszyks, J.D., Nuwaysir, L.M. y Witman, G.B. (1998) The catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase of ovine sperm flagella has a unique amino-terminal sequence. *J. Biol. Biochem.*, 273, 24874-24883.

San Agustin, J.T., Wilkerson, C.G. y Witman, G.B. (2000) The unique catalytic subunit of sperm cAMP-dependent protein kinase is the product of an alternative Cα mRNA expressed specificall in spermatogenic cells. *Mol. Biol. Cel.l*, 11, 3031-3044.

Sandberg, M., Levy, F.O., Øyen, O., Hansson, V. y Jahnsen, T. (1988) Molecular cloning, cDNA structure and deduced amino acid sequence for the hormone-induced regulatory subunit (RIIβ) of cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. *Biochem.Biophys. Res. Commun.*, 154, 705-711.

Sandberg, M., Taskén, K., Oyen, O., Hansson, V. y Jahnsen, T. (1987) Molecular cloning, cDNA structure and deduced amino acid sequence for a type I regulatory subunit cAMP-dependent protein kinase from human testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 149, 939-945.

Sanjuan Serrano, F., Fernández-González, M., Sanchéz López, J.L. y García Martín, L.O. (1995) Molecular mechanism of the control of glycogenolysis by calcium ions and cyclic AMP in the mantle of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Comp. Biochem. Physiol.*, 110B, 577-582.

Sanjuan, A. (1992) La identificación del mejillón de la Península Ibérica: variabilidad morfológica y polimorfismos alozímicos. *Tesis Doctoral*. Universidad de Santiago de Compostela. España.

Sanjuan, A., Quesada, C., Zapata, C. y Álvarez, G. (1986) Identificación del mejillón del NO. de la Península Ibérica como *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Acta. Cient. Compostel*, 23, 35-79.

Sanjuan, A., Quesada, H., Zapata, C. y Álvarez, G. (1990) On the ocurrence of Mytilus galloprovincialis Lmk. On NW coasts of the Iberica Peninsula . *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 143, 1-14.

Sanjuan, A., Zapata, C. y Álvarez, G. (1994) *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus edulis* on the coasts of the Iberica Peninsula. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 13, 131-146.

Sarkar, D., Erlichman, J. y Rubin, C.S. (1984) Identification of a calmodulin-binding protein that co-purifies with the regulatory subunit of brain protein kinase II. *J. Biol. Chem.*, 259, 9840-9846.

Sastri, M., Barraclough, D.M., Carmichael, P.T.y Taylor, S.S. (2005) A-kinase interacting protein localizes protein kinase A in the nucleus. Proc. *Natl. Acad. Sci. USA*., 102, 349-354.

Sawa, C., Nedea, E., Krogan, N., Wada, T., Handa, H., Greenblatt, J. y Buratowsky, S. (2004) Bromodomain factor 1 (Bdf1) is phosphorylated by protein kinase CK2. *Mol. Cell. Biol.*, 24, 4734-4742.

Schmidt, H. y Kamp, G. (1996) The Pasteur effect in facultative anaerobic metazoan. *Experientia,* 52, 440-448.

Schulman, H. y Greengard, P. (1978) Stimulation of brain membrane protein phosphorylation by calcium and an endogenous heat-stable protein. *P. Nature,* 271, 478-479.

Scott, J,D., Glaccum, M.B., Zoller, M.J., Uhler, M.D., Helfman, D.M., McKnight, G.S. y Krebs, E.G. (1987) The molecular cloning of a type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase from rat skeletal muscle and mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 84, 5192-5196.

Scott, J.D. (1991) Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Pharmacol Ther*., 50, 123-145.

Scott, J.D. y Pawson, T. (2000) Cell communication: the inside story. *Scientific American Magazine*, pp. 54-61.

Scott, J.D., Fischer, E.H., Takio, K., Demaille, J.G. y Krebs, E.G. (1985b) Amino acid sequence of the heat-stable protein inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*., 82, 5732-5736.

Seed, R. y Suchanek, T.H. (1992) Population and community ecology of *Mytilus*. En: *The mussel Mytilus: Ecology, physiology, genetics and culture* (Ed. Gosling, E.), pp. 87-169, Elsevier, Amsterdam

Shabb, J.B., Buzzeo, B.D., Ng, L. y Corbin, J.D. (1991) Mutating protein kinase cAMP-binding sites into cGMP-binding sites. *J. Biol. Chem.,* 266, 24320-24326.

Shabb, J.B., Poteet, C.E., Kapphahn, M.A., Muhonen, W.A., Baker, N.E. y Corbin, J.D. (1995) characterization of the isilated cAMP-binding B domain of cAMP-dependent protein kinase . *Protein Sci*., 4, 2100-2106.

Sharma, H.E. y Khuller, G.K. (2000) Purification and characterization of cAMP dependent protein kinase from *Microsporum gypseum. Biochim. Biophys Acta*, 1474, 100-106.

Shaywitz, A.J. y Greenberg, M.E. (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem*., 68, 821-861.

Shelud'ko, N.S., Matusovskaya, G.G., Pemyakova, T.V. y Matusovsky, O.S. (2004) Twitchin, a thick-filament protein from molluscan catch muscle, interacts with F-actin in a phosphorylation-dependent way. *Arch. Biochem. Biophys*., 432, 269-277.

Shelud'ko, N.S., Matusovsky, O.S., Permyakova, T.V. y Matusovskaya, G.G. (2007) «Twitchin–actin linkage hypothesis» for the catch mechanism in molluscan muscles: Evidence that twitchin interacts witch myosin, myorod, and paramyosin core and affects properties. *Arch. Biochem. Biophys* (en prensa).

Nikolay S. Shenolikar, S. (1994) Protein serine/Threonine phosphatase--new avenues for cell regulation. *Annu.Rev. Cell. Biol*. 10, 55-86

Shi, Z., Resing, K.A. y Ahn, N.G. (2006) Networks for the allosteric control of protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol*., 16, 686-692.

Shoji, S., Parmele, D.C., Wade, R.D., Kumar, S., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Neurath H., Long, G.L., Dermaille, J.G., Fischer, E.H. y Titani, K. (1981) Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMPc- dependent protein kinase. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*., 78, 848-851.

Shoji, S., Titani, K., Demille J.G. y Fischer, E. (1979) Sequence of two phosphorylated sites in the catalytic subunit of bovine cardiac muscle adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem*., 254, 6211-6214.

Shoji, S.S., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Fischer, E.H. y Titani, K. (1983) Amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine type II adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry*, 22, 3702-3709.

Showers, M.O. y Maurer, R.A. (1986) A cloned bovine cDNA encodes an alternate form the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 261, 16288-16291.

Siegman, M.J., Funabara, D., Kinoshita, S., Watabe, S., Hartshorne, D.J. y Butler, T.M. (1998) Phosphorylation of a twitchin-related protein controls catch and calcium sensitivity of force production in invertebrate smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 5383-5388.

Siegman, M.J., Mooers, S.U., Li, C., Narayan, S., Trinkle-Mulcahy, L., Watabe, S., Hartshome, D.J. y Butler, T.M. (1997) Phosphorylation of a high molecular weight (approximately 600 kDa) protein regulates catch in invertebrate smooth muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil*, 18, 655-670.

Silverman, H.G. y Roberto, F.F. (2006a) Cloning and expressions of recombinant adhesive protein Mefp-1 of the blue mussel, *Mytilus edulis. U.S.A. Patent no.* 6,987,170.

Silverman, H.G. y Roberto, F.F. (2006b) Cloning and expressions of recombinant adhesive protein Mefp-2 of the blue mussel, *Mytilus edulis. U.S.A. Patent no.* 6,995,012.

Silverman, L. y Resh, M. (1992) Lisien residues forma n integral component of a novel nh2-terminal membrana targeting motif for myristylated pp60v-src. *J. Cell. Biol.*, 119, 415-425.

Skalhegg, B. S., Huang, Y., Su, T., Idzerda, R. L., Mcknight, G. S. y Burton, K. A. (2002) Mutation of the caepha subunit of PKA leads to growth retardation and sperm dysfunction. *Mol. Endocrinol.*, 16, 630-639.

Skalhegg, B.S. y Tasken, K. (1997) Specificity in the cAMP/PKA signalling pathway differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front. Biosci.,* 2, d331-342.

Skalhegg, B.S., Landmark, B., Foss, K.B., Lohmann, S.M., Hansson, V., Lea, T y Jahnsen, T. (1992) Identification, purification, and characterization of subunits of cAMP-dependent protein kinase in human testis. Reverse mobilities of human RII alpha and RII beta on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis compared with rat and bovine RIIs. *J. Biol. Chem.*, 267, 5374-5379

Skibinski, D.O.F., Gallagher, C. y Beynon, C.M. (1994) Sex limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics*, 138, 801-809.

Slice, L.W. y Taylor, S.S. (1989) Expression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 264, 20940-20946.

Smith, C.M., Radzio-Andzelm, E., Madhusudan, Akamine, P. y Taylor, S.S. (1999) The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: prototype for an extended network of communication. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 71, 313-341.

Smith, C.M., Shindyalov, I.N., Veretnik, S., Gribskov, M., Taylor, S.S., Ten Eyck, L.F. y Bourne, P.E. (1997) The protein kinase resource. *Trends. Biochem. Sci*., 22, 444-446.

Smith, F.D., Langeberg, L.K. y Scott, J.D. (2006) The where's and when's of kinase anchoring *Trends. Biochem. Sci*., 31, 316-323.

Sokol, N.S. y Cooley, L. (1999) *Drosophila* filamin encoded by the cheerio locus is a component of ovarian ring canals. *Curr. Biol*., 9, 1221-1230.

Solberg, R., Tasken, K., Keiserud, A. y Jahnsen, T. (1991) Molecular cloning, cDNA structure and tissue-specific expression of the human regulatory subunit RI beta of cAMP-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys Res. Commun*, 176, 166-172.

Solberg, R., Tasken, K., Wen, W., Coghlan, V.M., Meinkoth, J.L., Scott, J.D., Jahnsen, T. y Taylor, S.S. (1994) Human regulatory subunit RI Beta of cAMP-dependent protein kinases: expression, holoenzyme formation and microinjection into living cells. *Exp. Cell. Res*., 214, 595-605.

Stefano, G.B., Cadet, P., Sinisterra, J., Charles, J., Kuruvilla, S. y Aiello, E. (1990) Functional neuroanatomy of Mytilus edulis: monoaminegic and opioid localisation . En: *Neurobiology of Mytilus edulis* (Ed. Stefano, G.B.), pp. 38-56, Manchester University Press, Manchester.

Steinberg, R.A., Cauthron, R.D., Symcox, M.M. y Shuntoh, H. (1993) Autoactivation of catalytic (Cα) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. *Mol.Cell. Biol*., 13, 2332-2341.

Stephens, R.E. y Prior, G. (1992) Dynein from serotonin-activated cilia and flagella: extraction characteristics and distinct sites for cAMP-dependent protein phosphorylation. *J. Cell. Sci*., 103, 999-1012.

Stewart, A.A., Ingebritsen, T.S., Manalan, A., Klee, C.B. y Cohen, P. (1982) Discovery of Ca2+-and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80). *FEBS. Lett.*, 137, 80-84.

Stewart, D.T., Saavedra, C., Stanwood, R.R., Ball, A.O. y Zouros, E. (1995) Male and female mitochondrial DNA lineage in the blue mussel *(Mytilus edulis)* species group. *Mol. Biol. Evol*., 12, 735-747.

Storey, K.B. (1985a) A re-evaluation of the Pasteur effect: new mechanism in anaerobic metabolism. *Mol. Physiol*., 8, 439-461.

Stossel T.P., Condeelis, J., Cooly, L., Hartwig, J.H., Noegel, A., Schleicher, M. y Shapiro, S.S. (2001) Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.,* 2, 138-145.

Struppe, J., Komives, E.A. y Taylor, S.S. (1998) R.R. Vold, ^{2}h nmr studies of a myristoylated peptide in neutral and acidic phospholipids bicelles. *Biochemistry*, 37, 15523-15527.

Su, Y., Dostmann, W.R.G., Herberg, F.W., Durick, K., Xuong, N-h., Ten Eyck, L., Taylor, S.S. y Varughese, K.I. (1995) Regulatory subunit of protein kinase A: Structure of deletion mutant with cAMP binding domains. *Science*, 269, 807-813.

Sugden, P.H., Holladay, L.A., Reimann, E.M. y Corbin, J.D. (1976) Purification and characterization of the catalytic subunit of adenosine 3′:5′-cyclic monophosphate-dependent protein kinase from bovine liver. *Biochem.J.*, 159, 409-422.

Sun, C. y Waite, J.H. (2005) Mapping chemical gradients within and along a fibrous structural tissue, mussel byssal threads. *J. Biol. Chem.*, 280, 39332-39336.

Sutherland, E.W. y Wosilait, W.E. (1955) Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature,* 175, 169-170.

T

Tabish, M., Clegg, R.A., Rees, H.H. y Fischer, M.J. (1999) Organization and alternative splicing of the *Caenorhabditis elegans* cAMP-dependent protein kinase catalytic-subunit gene (kin-1). *Biochem. J.*, 339, 209-216.

Tabish, M., Clegg, R.A., Turner, C.P., Jonczy, J., Rees, H.H. y Fisher, M.J. (2006) Molecular characterisation of cAMP-dependent protein kinase (PK-A) catalytic subunit isoforms in the male tick, Amblyomma hebraeum. *Mol. Biochem. Parasitol*., 150, 330-339.

Tachikawa, M., Nakagawa, H., Teresaki, A.G., Mori, H. y Ohashi, K. (1997) A 260-kDa filamin/ABP-related protein in chicken gizzard smooth muscle cells is a new component of the dense plaques and dense bodies of smooth muscle. *J. Biochem*., 122, 314-321.

Tada, M., Kirschberger, M.A. y Katz, A.M. (1975) Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the carddiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3′:5′-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 250, 2640-2647.

Takafuta, T., Wu, G., Murphy, G.F. y Shapiro, S.S. (1998) Human β-filamin is a new protein that interacts with the cytoplasmic tail of glycoprotein Ibα. *J. Biol. Chem*., 273, 17531-17538.

Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M. y Nishizuka, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J. Biol. Chem.,* 252, 7603-7609.

Takio, K., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. y Titani, K. (1984) Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type IIα adenosine cyclic 3′,5′-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry*, 23, 4200-4206.

Tamanini, A., Berton, G. y Cabrini, G. (1991) Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase from human placenta: characterization of the catalytic subunit. *Enzyme*., 45, 97-108.

Tash, J.S. (1989) Protein phosphorylation: the second messenger signal tranducer of flagellar motility. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 14, 332-339.

Taskén, K. y Aandahl, E.M. (2004) Localized effects of cAMP by distinct routes of protein kinase A. *Physiol. Rev*., 84, 137-167.

Tauc, L. (1966) Physiology of the nervous system. En: *Physiology of the Mollusca,* vol. II (Eds. Wilbur, K. y Yonge, C.M.), pp. 387-441, Academic Press, New York.

Taylor, S.S. y Ghosh, G. (2006) Protein kinases: catalysis and regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol*., 16, 665-667.

Taylor, S.S., Buechler, J.A. y Knighton, D.R. (1990) cAMP-dependent protein kinase: mechanism for ATP: protein phosphotransfer. En: *Peptides and protein phosphorylation* (Ed. Kemp, B.E.), pp. 1-41, CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Taylor, S.S., Buechler, J.A. y Yonemoto, W. (1990b) cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem*., 59, 971-1005.

Taylor, S.S., Kim, C., Vigil, D., Haste, N.M., Yang, J., Wu, J. y Anand, G.S. (2005) Dynamics of signalling by PKA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1754, 25-37.

Taylor, S.S., Yang, J., Wu, J., Haste, N.M., Radzio-Andzelm, E. y Anad, G. (2004) PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*, 1697, 259-269.

Taylor, S.S., Zheng, J., Radzio-Andzelm, E., Knighton, D.R., Ten Eyck, L.F., Sowadski, J.M., Herberg, F.W. y Yonemoto, W.M. (1993b) cAMP-dependent protein kinase defines a family of enzymes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*, 340, 315-324.

Tegge, W., Frank, R., Hofmann, F. y Dostmann, W.R.G. (1995) Determination of cyclic nucleotide-dependent protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on cellulose paper. *Biochemistry,* 34, 10569-10577.

Thalhofer, H.P., Daum, G., Harris, B.G. y Hofer, H.W. (1988) Identification of two different phosphofructokinase-phosphorylating protein kinase from *Ascaris suum*. *J. Biol. Chem*., 263, 952-957.

The UniProt Consortrum (2007) The Universal Protein Recurce (UniProt). *Nucl. Acids. Res*., 35, D193-197.

Theede, H., Ponat, A., Hiroki, K. y Schlieper, C. (1969) Studies on the resistence of marine bottom invertebrates to oxygen deficiency and hydrogen sulphide. *Mar. Biol*., 2, 325-336.

Theurkauf, W.E. y Vallee, R.B. (1992) Molecular characterization of the cAMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2. *J. Biol. Chem.*, 257, 3284-3290.

Tholey, A., Pipkorn, R., Bossemeyer, D., Kinzel, V. y Reed, J. (2001) Influence of myristoylation, phosphorylation, and deamidation on the structural behaviour of the N-terminus of the catalytic subunit of CAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 40, 225-231.

Thompson, T.G., et al. (2000) Filamin 2 (FLN2): a muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J. Cell. Biol.*, 148, 115-126.

Thullner, S., Gesellchen, F., Wiemann, S., Pyerin, W., Kinzel, V. y Bossemeyer, D. (2000) The protein kinase A catalytic subunit Cβ2: molecular characterization and distribution of the splice variant. *Biochem. J.*, 351, 123-132.

Tigges, U., Koch, B., Wissing, J., Jockusch, B.M. y Ziegler, W.H. (2003) the F-actin cross-linking and focal adhesion protein filamin A is a ligand and *in vivo* sustrate for protein kinase Cα. *J. Biol. Chem.*, 278, 23561-23569.

Titani, K., Sasagawa, T., Ericsson, L.H., Kumar, S., Smith, S.B., Krebs, E.G. y Walsh, K.A (1984) Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type Iα adenosine cyclic 3′,5′-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry,* 23, 4193-4199.

Toda, T., Cameron, S., Pass, P., Zoller, M., Scout, J.D. McMullen, B., Hurwitz, M., Brebs, E.G. y Wigler, M. (1987a) Cloning and characterization of *BCY1*, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol.*, 7, 1371-1377.

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. y Wigler, M. (1987b) There different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell.*, 50, 277-287.

Toker, A. y Cantley, L.C. (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature,* 387, 673-676.

Toner-Webb, J., Van, P.S., Walsh, D.A. y Taylor, S.S. (1992) Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 267, 25174-25180.

Tonks, N.K. (2006) Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 7, 833-846.

Trotter, K.W., Fraser, I.D., Scott, G.K., Stutts, M.J., Scott, J.D. y Milgram, S.L. (1999) Alternative splicing regulates the subcellular localization of A-kinase anchoring protein 18 isoforms. *J. Cell. Biol.*, 147, 1481-1492

Tsigelny, I., Greenberg, J.P., Cox, S., Nichols, W.L., Taylor, S.S. y Ten Eyle, L.F. (1999) 600 ps molecular dynamics reveals stable substrate and flexible hinge points in cAMP dependent protein kinase. *Biopolymers*, 50, 513-524.

Turner, R.M.O., Johnson, L.R., Haig-Ladewig, L., Gerton, G.L. y Moss, S.B. (1998) An X-linked gene encodes a major human sperm fibrous sheath protein, hAKAP82. *J. Biol. Chem.*, 273, 32135-32141.

Twarog, B.M. (1967) The regulation of catch in molluscan muscle. *J. Gen. Physiol.*, 50, 157-169.

U

Uhler, M.D., Carmichael, D.F., Lee, D.C., Chrivia, J.C., Krebs, E.G. y McKnight, G.S. (1986a) Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83, 1300-1304.

Uhler, M.D., Chrivia, J.C. y McKnight, G.S. (1986b) Evidence for a second isoforma of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 261, 15360-15363.

Ushiro, H. y Cohen, S. (1980) Identification of phosphotyrosine as a product of epidermel growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J. Biol. Chem.*, 255, 8363-8365.

V

van der Flier, A. y Sonnenberg, A. (2001) Structural and functional aspects of filamins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1538, 99-117.

van der Ven, P.F.M., Obermann, W.M.J., Lemke, B., Gautel, M., Weber, K. y Fürst, D. (2000) Characterization of muscle filamin isoforms suggests a posible role of γ-filamin/ABP-L in sarcomeric Z-disc formation. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 45, 149-162.

Van Patten, S.M., Hotz, A., Kinzel, V. y Walsh, D.A. (1988) the inhibitor protein of the catalytic cAMP-dependent protein kinase-catalytic subunit interaction. Composition of multiple complex. *Biochem. J.*, 256, 785-789.

Vardanis, J. (1980) A unique cyclic nucleotide-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 255, 7238-7243.

Vibert, P., Edelstein, S.M., Castellani, L. y Elliott, B.W.(1993) Minititins in striated and smooth molluscan muscles: structure, location and immunological crossreactivity. *J. Muscle Res. Cell. Motil,* 14, 598-607.

Vigil, D., Blumenthal, D.K., Taylor, S.S y Trewhella, J. (2006a) Solution scattering reveals large differences in the global structures of type II protein kinase A isoforms. *J. Mol. Biol.*, 357, 880-889.

Vigil, D., Blumenthal, D.K., Taylor, S.S. y Trewhella, J. (2005) The conformationally dynamic C helix of the RIα subunit of protein kinase A mediates isoform-specific domain reorganization upon C subunit bending. *J. Biol. Chem.*, 280, 35521-35527.

Vigil, D., Lin, J-H., Sotriffer, C.A., Pennypacker, J.K., Mccammon, J.A. y Taylor, S.S. (2006b) A simple electrostatic switch important in the activation of type I protein kinase A by cyclic AMP. *Protein Sci.*, 15, 113-121.

Vijayaraghavan, S. y Hoskins, D.D. (1985) Forskolin stimulates bovine epididymal sperm motility and cyclic AMP levels. *J. Cyclic Nucleotide Phosphor. Res.*, 10, 499-510.

Vijayaraghavan, S., Olson, G.E., NagDas, S., Winfrey, V.P. y Carr, D.W. (1997) Subcellular localization of the regulatory subunits of cyclic adenosine 3′,5′-monophosphate-dependent protein kinase in bovine spermatoza. *Biol. Reprod.*, 57, 1517-1523.

Villalba, A. (1995) Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (N.W. Spain) *Aquaculture*, 130, 269-277.

Vincent, J.B., Crowder, M.W. y Averill, B.A. (1992) Hydrolysis of phospahate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *Trends. Biochem. Sci.,* 17, 105-110.

Vitellaro-Zucarrello, L. (1980) The collagen gland of Mytilus: an ultrastuctural and cytochemical study on secretory granules. *J. Ultrastruct. Res.*, 73, 135-147.

Vitellaro-Zucarrello, L. (1981) Ultrastructural and cytochemical study on the enzyme gland of the foot of a mollusc. *Tissue Cell.*, 13, 701-713.

Vitellaro-Zucarrello, L. (1983) Ultrastructural and cytochemical study of a mucous gland of the foot of *Mytilus galloprovincialis. Basic. Appl. Histochem.*, 27, 103-115.

Viterallo-Zucarello, L. y De Biasi, S. (1988) GABA-linke inmunoreactivity in the pedal ganglio of *Mytilus galloprovincialis*: Light and electrón microscopy Study. *J. Comp. Neurol*, 267, 516-524.

W

Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Kawase, H., Hiramoto, M., Ferdous, A., Takayama, M., Lee, K.A., Hurst, H.C. y Handa H. (1996) Copurification of casein kinase II with transcription factor ATF/E4TF3. *Nucleic. Acids. Res.*, 24, 876-884.

Waite, J.H. (1992) The formation of mussel byssus: anatomy of a natural manufacturing process. En: *Results and problems in cell differentiation,* vol. 19, Biopolymers (Ed. Case, S.T.), pp. 27-54, Springer-Verlag, Berlin.

Waite, J.H. (2002) Adhesion á la moule. *Integr. Comp. Biol.*, 42, 1172-1180.

Waite, J.H., Qin, X-X. y Coyne, K.J. (1998) The peculiar collagens of mussel byssus. *Matrix Biol*., 17, 93-106

Walsh, D.A., Angelos, K.L., Van Peten, S.M., Glass, D.B.y Garetto, L.P. (1990) The inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase. En *Peptides and protein phosphorylation* (Ed. Kemp, B.E.), pp. 43-84, CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Walsh, D.A., Ashby, C.D., Gonzales, C., Calkins, D. y Fischer, E.H. (1971) Krebs EG: Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem*., 246, 1977-1985.

Walsh, D.A., Perkins, J.P. y Krebs, E.G. (1968) An adenosine 3', 5'- monophosphate dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.,* 243, 3763-3765.

Wang, L., Sunahara, R.K., Krumins, A., Perkins, G., Crochiere, M.L., Mackey, M., Bell, S., Ellisman, M.H. y Taylor, S.S. (2001) Cloning and mitochondrial localization of full-length D_AKAP2, a protein kinase A anchoring protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 98, 3220-3225.

Weber, I.T., Shabb, J.B. y Corbin, J.D. (1989) Predicted structures of the cGMP binding domains of the cGMP dependent protein kinase-A key alanine threonine difference in evolutionary divergence of cAMP and cGMP bindings sites. *Biochemistry*, 28, 6122-6127.

Weber, I.T., Steitz, T.A., Bubis, J. y Taylor, S.S. (1987) Predicted structures of cAMP binding domains of type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 26, 343-351.

Weldon, S.L., Mumby, M.C. y Taylor, S.S. (1985) The regulatory subunit of neural cAMP-dependent protein kinase II represents a unique gene product. *J. Biol. Chem*., 260, 6440-6448.

Wen, W., Harootunian, A.T., Adms, S.R., Feramisco, J. Tsien, R.Y., Meinkoth, J.L. y Taylor, S.S. (1994) Heat-stable inhibitors of cAMP-dependent protein kinase carry a nuclear export signal. *J. Biol. Chem*., 269, 32214-32220.

Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y. y taylor, S.S. (1995) identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell*., 82, 463-473.

Weyel, W. y Wegener, G. (1996) adenine nucleotide metabolism during anoxia and postanoxic recovery in insects. *Cell. Mol. Life Sci*., 52, 474-480.

White, K.M. (1937) *Mytilus* Memorian. Liverpool. *Mar. Biol. Comm*., 37, 1-117.

Whitehouse, S. y Walsh, D.A. (1983) Inhibor protein of the cAMP-dependent protein kinase: Characteristics and purification. *Methods. Enzymol*., 99, 80-93.

Whitehouse, S., Feramisco, J.R., Casnellie, J.E., Krebs, E.G. y Walsh, D.A. (1983) Studies on the kinetic mechanism of the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 258, 3693-3701.

Wiemann, S., Kinzel, V. y Pyerin, W. (1991a) Isoform Cβ2, an unusual form of the bovine catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 266, 5140-5146.

Wiemann, S., Kinzel, V. y Pyerin, W. (1992) Cloning of the Cα catalytic subunit of the bovine cAMP-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1171, 93-96.

Wiemann, S., Voβ, H., Kinzel, V. y Pyerin, W. (1991b) Rat Cα catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase: cDNA sequence and evidence that it is the only isoform expressed in myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1089, 254-256.

Wilks, A.F. y Harpur, A.G. (1994) Cytokine signal transduction and the JAK family of protein tyrosine kinases. *Bioessays,* 16, 313-320.

Wilks, A.F., Harpur, A.G., Kurban, R.R., Ralph, S.J. y Zurcher, G. (1991) Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol. Cell. Biol.,* 11, 2057-2065.

Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., et al. (1994) 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans. Nature*, 368, 32-38.

Wong, W. y Scott, J.D. (2004) AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5, 959-970.

X

Xie, Z., Xu, W., Davie, E.W. y Chung, D.W. (1998) Molecular cloning of human ABPL, an actin-binding protein homologue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251, 914-919.

Y

Yamada, A., Yoshio, M., Nakamura, A., Kohama, K. y Oiwa, K. (2004) Protein phosphatase 2B dephosphorylates twitchin, initiating the catch state of invertebrate smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, 279, 40762-40768.

Yonemoto, W., Garrod, S.M., Bell, S.M. y Taylor, S.S. (1993a) Identification of phosphorylation sites in the recombinant catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 268, 18626-18632.

Yonemoto, W., McGlone, M.L. y Taylor, S.S. (1993b) N-myristylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase conveys structural stability. *J. Biol. Chem.*, 268, 2348-2352.

Yonemoto, W., McGlone, M.L., Grant, B. y Taylor, S.S. (1997) Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *Prot. Eng.*, 10, 915-925.

Yonemoto, W.M., McGlone, M.L., Slice, L.W. y Taylor, S.S. (1991) Prokaryotic expression of catalytic subunit of adenosine cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Methods. Enzymol.*, 200, 581-596.

Yoon, M.Y. y Cook, P.F. (1987) Chemical mechanism of the adenosine cyclic 3',5'-monophosphate dependent protein kinase from pH studies. *Biochemistry*, 26, 4118-4125.

Z

Zawadzki, K. M. y Taylor, S. S. (2004) cAMP-dependente protein kinase regulatory subunit type II β. *J. Biol. Chem.*, 279, 7029-7036.

Zelada, A., Passeron, S., Gomez, S.L. y Cantore, M.L. (1998) Isolation and characterization of cAMP-dependent protein kinase from *Candida albicans*. Purification of the regulatory and catalytic subunits. *Eur. J. Biochem.*, 252, 245-252.

Zetterqvist, O., Ragnarsson, U. y Engström, L. (1990) Substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. En: *Peptides and protein phosphorylation* (Ed. Kemp, B.E.), pp. 171-187, CRC Press, Boca Ratón, Florida.

Zhang, W., Morris, G.Z. y Beebe, S. (2004) Characterization of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit Cγ expressed and purified from sf9 cells. *Protein Expr. Purif.*, 35, 156-169.

Zheng, J., Knighton, D.R., Ten Eyle, L.F., Karlsson, R., Xuong, N., Taylor, S.S. y Sowadsky, J.M. (1993a) Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor. *Biochemistry*, 32, 2154-2161.

Zheng, J., Knighton, D.R., Xuong, N.-h., Taylor, S.S., Sowadski, J.M. y Ten Eyck, L.F. (1993b) Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed conformations. *Protein Sci.*, 2, 1559-1573.

Zhou, J. y Adams, J.A. (1997) Is there a catalytic base in the active site of cAMP-dependent protein kinase?. *Biochemistry*, 36, 2977-2984.

Zick, S.K. y Taylor, S.S. (1982) Interchain disulfide bonding in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I. *J. Biol. Chem.*, 257, 2287-2293.

Zimmermann, B., Chiorini, J.A., Ma, Y. y Kotin, R.M. (1999) PrPX is a novel catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase regulated by the regulatory subunit type I. *J. Biol. Chem.*, 274, 5370-4378.

Zoller, M.J., Nelson, N.C. y Taylor, S.S. (1981) Affinity labelling of cAMP-dependent protein kinase with p-fluorosulfonylbenzoyl adenosine. Covalent modification of lysine 71. *J. Biol. Chem*., 256, 10837-10842.

Zorn, M., Fladmark, K.E., Ogreid, D., Jastorff, B., Doskeland, S.O. y Dostmann, W.R. (1995) Ala335 is essential for high-affinity cAMP-binding of both sites A and B of cAMP-dependent protein kinase type I. *FEBS. Lett*., 362, 291-294.

Zouros, E., Ball, A.O., Saavedra, C. y Freeman, K.R. (1994) An inusual type of mitochondrial DNA intheritance in the blue mussel *Mytilus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 91, 7463-7467.