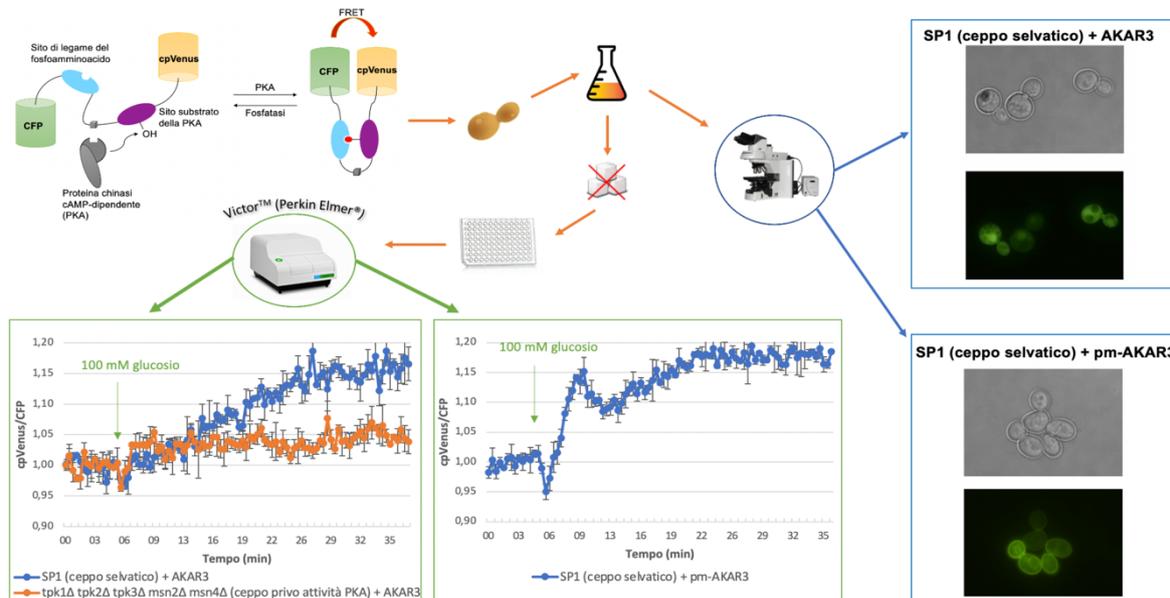


GRAPHICAL ABSTRACT



Monitoraggio dell'attività della PKA in popolazioni cellulari di *Saccharomyces cerevisiae* tramite l'impiego di nanosensori basati sulla FRET

Elisa Longoni, Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, UNIMIB
Gruppo di Ricerca: Sonia Colombo, Enzo Martegani

Lo scopo del lavoro è stato quello di mettere a punto le condizioni per poter utilizzare la sonda AKAR3 per monitorare l'attività della proteina chinasi cAMP dipendente (PKA) in popolazioni cellulari di *S. cerevisiae* utilizzando il Victor™ (Perkin Elmer®), un lettore di piastre. AKAR3 è una proteina di fusione composta da un dominio di legame per un fosfoaminoacido e da una sequenza contenente un sito di fosforilazione specifico per la PKA, fiancheggiata dalla CFP e dalla CpVenus. In seguito a fosforilazione da parte della PKA, si ha una modificazione conformazionale della sonda, tale da determinare un aumento nella FRET. Dopo aver messo a punto le condizioni, l'attività della PKA è stata monitorata nei ceppi selvatici SP1 e W303-1A, trasformati con la sonda AKAR3, che risulta distribuita omogeneamente all'interno delle cellule. In entrambi i ceppi, la FRET aumenta in seguito ad aggiunta di glucosio a cellule poste in carenza di questo zucchero. Come atteso, nel ceppo mutante *tpk1Δ tpk2Δ tpk3Δ msn2Δ msn4Δ* (privo dell'attività della PKA), non si registra un aumento significativo nella FRET. Successivamente, l'attività della PKA è stata monitorata nei ceppi SP1 e W303-1A, trasformati con la sonda pm-AKAR3, espressa a livello della membrana plasmatica e della membrana vacuolare. L'analisi al Victor™ mostra una cinetica bifasica, caratterizzata da un primo incremento transiente della FRET, presumibilmente dovuto all'attivazione della chinasi localizzata in membrana plasmatica, seguito da un incremento tardivo e prolungato nel tempo, presumibilmente dovuto all'attivazione della PKA presente in prossimità della membrana vacuolare e nel citoplasma. I dati ottenuti mostrano che è possibile utilizzare queste sonde per monitorare l'attività della PKA in popolazioni cellulari di *S. cerevisiae*, dal sito di inizio del segnale ad altre regioni attraverso le quali il segnale viene propagato.