



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Estudios bioquímicos de las isoformas Tpk1p y
Tpk2p de la PKA de Candida albicans**

Nº 187

Andrea Nora Motter

Tutora: María Leonor Cantore

Departamento de Investigación
Septiembre 2005

A Chita

Agradecimientos:

A Maria Leonor Cantore: por haber sido una gran profesora y la directora de este trabajo; por su paciencia, por el relevo en los «eternos ensayos», por dejarle las peores partes, por todo lo que me enseñó, por su apoyo y por haber creído en mí.

A Susana Passeron: por haberme dado la posibilidad de trabajar en su laboratorio y la revisión final de este trabajo.

A Guadalupe Souto (Guada): por haberme instruido en la parte «genética» de *Cándida*, por sus enseñanzas y por estar siempre dispuesta a darme una mano, por la «tarea para el hogar», por su confianza y por reírse de mis «fox terrier». ¡Gracias prima!

A «Las Normas», por sus ganas, sus chistes, por salvarme de más de un apuro y la buena onda tan temprano a la mañana; a Puchi por sus consejos, revisiones y los trabajos sucios compartidos y a Kerber por encontrarle solución a todo.

A Romi: por continuar con ella en esta etapa y haber compartido toda la carrera, por ser una gran amiga, por entenderme, por darme más de una mano, por los «mami» y por saber escuchar y bancarme

A Chu: por ser una gran amiga, por las fotocopias, los apuntes, por dar siempre lo mejor, por mimarme, ser una excelente persona y estar siempre.

A los chicos de «arriba», a Jorge por arreglarlo todo «para ayer», a Graciela, Irma y Tere por los «desayunos»

A la Cátedra de Genética de la Facultad de Veterinaria (UBA): por haber sido el lugar de mi práctica profesional. Especialmente a Maria Gabriela Iglesias y Mikel Huguet: mis primeros «jefes», por sus enseñanzas, su paciencia y por hacerme sentir cómoda y útil, por los mates y por soportar mi «manía química». Por ser dos grandes personas y excelentes profesionales. («los desmosomas existen Mikel !!!!»)

A Silvia González: por ayudarme a salir de las situaciones más complicadas, por incentivar me siempre a seguir; por sus preguntas, por sus respuestas y por la pila de «papers» y libros que me consiguió.

A mis grandes amigos y afectos: Laura (Guille y Agustina), Emilse, Dolores, Claudia (Pablo, Lucía y Juan), Nando, Bachi, Romina, Viviana, Jurqui, Luli y Pri; por las veces que aguantaron mi mal humor, por los cumpleaños que no estuve, por las charlas que postergué, por estar pendientes de mis materias y mis cosas; por escuchar mis eternas charlas científicas -en muchos casos, sin entender nada- pero poniendo lo mejor de sí para compartir todo esto.

A Domingo, Juan, Christian y Lali por «bancarme». A mis compañeros de trabajo, los que me apoyaron y vivieron esta Tesina a mi par, por la fuerza que me transmitieron para no aflojar. A Marcelo («el eterno») por entender mi cansancio y apoyarme siempre. Gran parte de este trabajo hubiera sido imposible sin ello.

A Galo: por sus grandes charlas hasta la madrugada, por escuchar y tratar de entender lo inentendible, por retarme, por estar siempre dispuesto a todo, por tantos años y por bancarme siempre.

A mis tíos Tete, Coco, Marengo y al tío Victor por mi primer «juego de química».

A Mariana: mi «gran hermana», mi mejor mitad y con quien comparto parte de este camino, (no precisamente la parte química), por todas las charlas, por tantos abrazos, por todas las risas, por aquel café en «Les Champs Elyseès», por estar siempre conmigo y por su inquebrantable fuerza. Te quiero con el alma enana!!

A Papá: por bancarme siempre, por ser fiel a sus principios, por su contagiosa pasión por la historia, por defender lo indefendible, por enseñarme a «creer en los ideales» y por colgar la bandera juntos.

A Mamá (Chita): por «TODO», por su fe en mí, por sus mates, su paciencia, por despertarme con una sonrisa, por pelearla siempre y ganarla; por los libros compartidos, por las charlas, por su empuje, por estar al lado mío y vivir cada experiencia como propia. Sin ella, esta primera página no hubiera existido.

Gracias

Andre

Objetivos

Los resultados comentados en el último párrafo de la Introducción plantearon la necesidad de encarar el análisis de otros factores, más allá de los niveles de la actividad de PKA, para profundizar el estudio del mecanismo bioquímico de la diferenciación levadura 'l micelio en *C. albicans*. Entre los factores que podrían explicar la existencia de roles diferenciales de las isoformas Tpk1p y Tpk2p, y por ende de las holoenzimas derivadas, están las propiedades bioquímicas de ambas enzimas. Por otro lado, con respecto a la subunidad regulatoria, datos anteriores de nuestro laboratorio habían demostrado, trabajando con una cepa salvaje, que R es una fosfoproteína *in vivo* y que *in vitro* la forma fosforilada en el sitio de autofosforilación tiene menor afinidad por C. En *S. cerevisiae*, el estado de fosforilación de R está relacionado también con su localización subcelular (ver Introducción). Resultó entonces interesante analizar el estado de fosforilación de R en las distintas cepas ya que esta modificación podría estar implicada en la modulación de las holoenzimas *in vivo*.

En consecuencia, en este trabajo se abordaron fundamentalmente:

- A. La evaluación de dos características bioquímicas de las isoenzimas: Km para el sustrato y disociación por AMPc
- B. El estudio de la posible modificación diferencial de la subunidad regulatoria por fosforilación.

Resumen

Trabajos previos de nuestro laboratorio y de otros han demostrado que la vía de señalización celular AMPc/PKA está involucrada en la respuesta de *C. albicans* a alguno de los factores ambientales que controlan su morfología y que la actividad enzimática de las dos isoformas presentes de PKA (Tpk1p y Tpk2p) tienen un rol positivo en el proceso. Trabajando con cepas nulas para los genes de una u otra isoforma surgieron resultados inesperados en el sentido en que de las dos cepas mutantes la que presenta una actividad catalítica mucho menor es la que muestra una mayor capacidad germinativa medida como formación de hifas verdaderas. Estos antecedentes señalaron la necesidad de profundizar en la caracterización bioquímica de las isoformas de la PKA con el objeto de avanzar en la comprensión de los mecanismos bioquímicos subyacentes en el proceso morfogenético.

En este trabajo de Tesina se comenzó el estudio de algunas de las propiedades cinéticas de las isoformas Tpk1p y Tpk2p y se inició el estudio del estado de fosforilación de la subunidad regulatoria. Como primer paso de este segundo ítem se puso a punto el ensayo de desfosforilación de proteínas con la fosfatasa.

Respecto de las características cinéticas no se encontró diferencia relevante en cuanto a la concentración de AMPc necesaria para la activación de las dos enzimas por AMPc pero sí en lo que se refiere a sus Kms. En efecto, la Km para la isoforma Tpk1p es 10 veces mayor que para Tpk2p; esto es un fuerte indicio de una muy baja afinidad de Tpk1p por el sustrato usado en el ensayo estándar y explica los resultados obtenidos en la medición en extractos crudos. La Vm es también sensiblemente menor que en Tpk2p. Los resultados del mismo análisis en CA14 reflejan, como era de esperar, las propiedades de Tpk2p, es decir Km y Vm dentro de los valores esperados para una PKA de eucariotas inferiores.

Respecto de la evaluación del estado de fosforilación de R, una vez puesto a punto el tratamiento con la fosfatasa utilizando la proteína R recombinante de *C. albicans*, se sometieron a desfosforilación los extractos de las tres cepas. Se encontró que el tratamiento promueve la desaparición de una de las dos bandas del doblete que presenta R proveniente de las cepas CA14 y *tpk1* y no produce cambios en la única banda que presenta la cepa *tpk2* lo cual parece indicar una diferencia en la modificación de la subunidad regulatoria de las tres cepas.

Materiales y métodos

1. Organismos y condiciones de cultivo

1.1. *Candida albicans*, generalidades

Candida albicans es un hongo patógeno oportunista de vertebrados homeotermos, causante de una de las micosis más comunes y de mayor incidencia mundial en el ser humano: la candidiasis. *C. albicans* es un hongo diploide perteneciente a la familia Ascomycota, clase Saccharomycetes, orden Saccharomycetales, subclase Saccharomycetales anamórficos, género *Cándida*. Se reproduce asexualmente por gema-

ción, con producción de blastosporas y se considera una levadura imperfecta ya que no se le conoce ciclo sexual.

C. albicans es capaz de desarrollar células ovoides simples (blastosporas y clamidosporas) o células alargadas que desarrollan hifas multicelulares verdaderas y pseudohifas. Las hifas verdaderas, están formadas por células alargadas y cilíndricas que crecen por extensión apical continua, separadas por paredes septadas perpendiculares. Las pseudohifas se diferencian de las hifas en su modo de formación; se desarrollan a partir de blastosporas por brotación unipolar: el brote se desarrolla como célula alargada que permanece unida a la célula madre, detiene su crecimiento y reanuda la brotación; microscópicamente se observa una notoria constricción de las paredes en el sitio de formación de los septos. Las clamidosporas son células esféricas de pared engrosada que se desarrollan a partir de pseudohifas (Odds, 1988). La Figura 1, A y B, muestra las distintas morfologías del hongo. La capacidad de *C. albicans* de adoptar diferentes morfologías podría contribuir a la colonización y diseminación dentro de los tejidos del huésped promoviendo la infección (Odds, 1994).

Este hongo es un comensal habitual de los tractos respiratorio, gastrointestinal, genitourinario y con menos frecuencia se lo encuentra en piel. La mayoría de las personas son portadoras sanas, sin embargo, bajo determinadas condiciones el hongo se torna infeccioso, provocando candidiasis. La candidiasis puede presentarse con distintos grados de severidad, existiendo tres tipos básicos de infecciones: superficial, localmente invasiva y sistémica. Suele aparecer asociada a otras enfermedades, desórdenes fisiológicos, trastornos endócrinos, alcoholismo, terapias prolongadas con antibióticos de amplio espectro y/o terapias esteroidogénicas.

Las infecciones superficiales son las más comunes, se producen en las mucosas de la cavidad oral y tracto respiratorio. La candidiasis localmente invasiva ocurre en pacientes inmunocomprometidos y se presenta como ulceraciones del tracto intestinal, respiratorio o génito-urinario. La candidiasis sistémica es la variedad más severa e involucra la infección invasiva del parénquima de órganos viscerales como corazón, riñón, hígado, bazo, pulmón y cerebro (Odds, 1988).

La incidencia de la candidiasis sistémica ha aumentado en forma sostenida y alarmante en los últimos veinte años debido principalmente al aumento en las causas de depresión del sistema inmune como los tratamientos de quimioterapia, trasplantes de órganos y especialmente al avance del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y es la causante de la tercera parte de las muertes de enfermos de SIDA, la misma cifra vale para los pacientes con leucemia terminal y trasplantados de médula ósea.

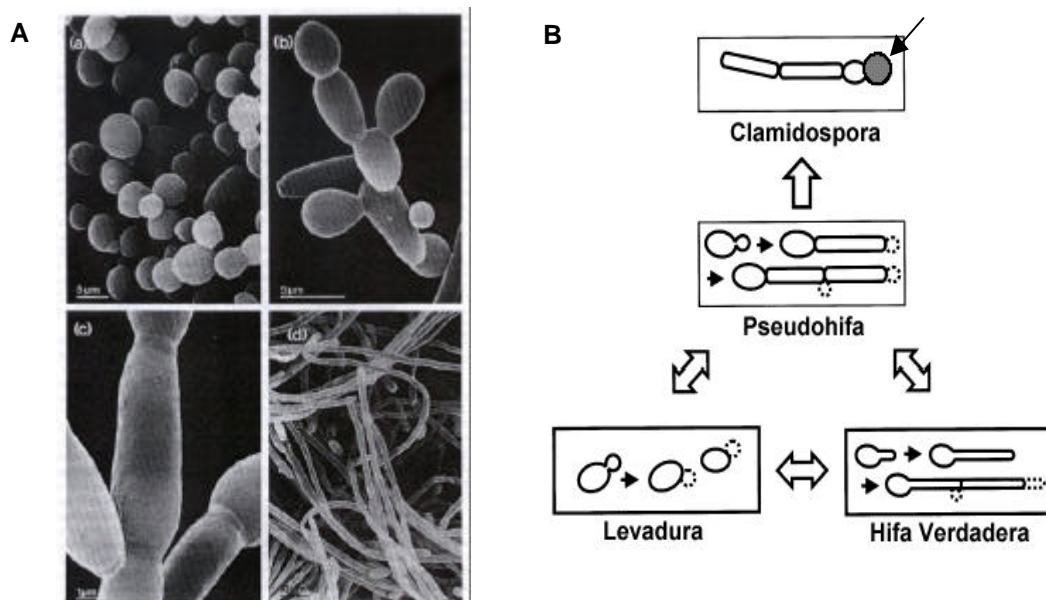


Figura 1. Morfologías de *C. albicans*. A. Fotografías al microscopio electrónico de las diferentes morfologías: (a) *blastosporas*, células ovoides; (b) *pseudohifas*, las constricciones de la pared celular muestran claramente que estas células son cadenas de blastosporas y no hifas verdaderas; (c) se observan pseudohifas con mayor aumento; (d) *micelio* o hifa verdadera, las constricciones en los septos son mínimas o no se observan (tomado de Odds, 1988). B. Representación esquemática de las diferentes formas de *C. albicans* y su interacción. Las líneas de puntos indican las células hijas y las regiones de expansión celular. La flecha en el primer cuadro marca la posición de la clamidospora (tomado de Ernst, 2000).

1.1. Dimorfismo en *C. albicans*

El dimorfismo levadura-micelio exhibido por una gran variedad de especies fúngicas se define como el proceso reversible por el cual el hábito de crecimiento levaduriforme se transforma, por alguna alteración en las condiciones ambientales o de cultivo, en un hábito de crecimiento filamentosos o hifal como resultado de cambios que se producen a nivel celular (Stewart y Rogers, 1978). Este tipo de diferenciación no es un proceso esencial en el ciclo celular del hongo, sino que constituye una respuesta a un cambio en el hábitat en el cual se desarrolla.

Es de destacar que la mayoría de las especies fúngicas de importancia clínica son dimórficas, por lo que la comprensión de los mecanismos que regulan las transiciones dimórficas es de suma importancia para el control de un grupo de micosis cada vez más relevantes que afectan al hombre y a los animales y podría contribuir a comprender y controlar la enfermedad. En este sentido, *C. albicans* provee un modelo relativamente simple y fácil de manejar para el estudio de las bases moleculares de la morfogénesis y de la posible relación entre patogenicidad y morfología, que es aún motivo de debate.

La formación de micelio *in vitro* en *C. albicans*, está influenciada por la temperatura, la cantidad de inóculo, la composición del medio y la cepa. *In vitro*, la transición levadura-micelio es inducida por incubación a 37°C en presencia de compuestos tales como L-aminoácidos (Land y col., 1975), N-acetilglucosamina (NAcGlc) (Simonetti y col., 1974) y suero. El pH del medio de incubación también actúa como inductor de la germinación: mientras que a un pH cercano a 6,5 se favorece el desarrollo filamentosos, a un pH por debajo de 6 se estimula el crecimiento levaduriforme (Evans y col., 1975; Pollack y Hashimoto, 1987). No se han dilucidado en forma completa los mecanismos moleculares involucrados en la transducción de las señales extracelulares gatilladas por estos factores pero se conocen muchos de los elementos de las vías de señalización.

El hecho de que *C. albicans* sea diploide, carezca de ciclo sexual conocido y tenga una utilización inusual de codones (Santos y col., 1996), ha retrasado el estudio de los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en el dimorfismo, ya que se dificulta la manipulación genética impidiendo la identificación de factores involucrados en la transición dimórfica y el aislamiento e identificación de las mutaciones que afectan su patogenicidad.

Estas dificultades en la manipulación de *C. albicans* han sido subsanadas, en parte, debido a la gran conservación evolutiva de las vías de transducción de señales entre los hongos. Muchos de los genes involucrados en la transducción de señales en *C. albicans* conocidos hasta hoy han sido identificados funcionalmente usando complementaciones genéticas en *Saccharomyces cerevisiae*. Estas complementaciones explotan la habilidad que presentan los genes que codifican para proteínas de señalización en *C. albicans*, de suprimir defectos en los correspondientes genes de *S. cerevisiae* (Clark y col., 1995) o bien de interferir (Whiteway y col., 1992) o activar constitutivamente (Leberer y col., 1996) las correspondientes vías de señalización. La secuenciación del genoma de *C. albicans* (<http://www-sequence.stanford.edu/group/candida/>) ha facilitado el aislamiento directo de genes involucrados en la transducción de señales basándose en la similitud de secuencia con otros previamente identificados en *S. cerevisiae*; el análisis funcional de dichos genes sigue ligado a *S. cerevisiae* ya que en este organismo, las vías de señalización están mejor caracterizadas.

1.2. *C. albicans* y hormonas de mamíferos

Los cambios ambientales afectan profundamente la transición dimórfica en *C. albicans* y se han descrito varios inhibidores y estimuladores del proceso (Odds, 1988). Como se mencionó anteriormente, uno de los factores que predisponen a la infección por *C. albicans* es el estado inmunológico y/o hormonal del huésped. Se ha informado un efecto estimulador de esteroides y gonadotropina coriónica humana (hCG) (Caticha y col., 1992), prostaglandina E2 y el neurotransmisor β -endorfina (Kalo-Klein y Witkin, 1990) sobre la transición dimórfica. Se ha evaluado la existencia en *C. albicans* de receptores para las hormonas humanas. En este sentido, se han identificado proteínas de unión a corticoesteroides, a progesterona (Loose y col., 1981) y a estrógenos (Skowronski y Feldman, 1989). Se describió también, la existencia de sitios de unión específica y de alta afinidad para la hormona luteinizante (hLH) (Bramley y col., 1990). En nuestro laboratorio se demostró, por fluorescencia indirecta, la existencia de proteínas capaces de unir glucagón en la superficie de células levaduriformes enteras, lo que sugiere la presencia en la membrana de receptores reconocidos por la hormona (Zelada y col., 1996).

Desde el punto de vista de las actividades enzimáticas involucradas en los mecanismos gatillados por estas hormonas en mamíferos, trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que las enzimas y proteínas no enzimáticas del camino de transducción del AMPc están presentes y son funcionales en *C. albicans* y que además están moduladas durante la transición dimórfica (Paveto y col., 1990; Paveto y col., 1991; Paveto y col., 1992; Egidy y col., 1989; Egidy y col., 1990).

En conjunto, estos resultados sugieren que *C. albicans* es capaz de sensor cambios hormonales del hospedador, los cuales son transmitidos al interior de la célula a través de la vía de señalización de AMPc, desencadenando, en ciertas circunstancias, la transición dimórfica. Actualmente, ver ítem 2.3, se han individualizado la mayoría de los genes involucrados en este sendero.

2. Transducción de señales

La célula eucariota es una entidad altamente regulada, capaz de responder a los estímulos generados en su entorno.

Estos procesos de estímulo-respuesta se llevan a cabo a través de una cascada de reacciones que involucran enzimas específicas, proteínas regulatorias y otros factores. El primer paso de estas cascadas es la transformación del estímulo externo en una señal intracelular por interacción directa de dicho estímulo con receptores celulares específicos. Luego, el mensaje intracelular es traducido en actividades regulatorias que finalmente modifican y regulan las proteínas involucradas en la respuesta biológica.

Los estímulos externos operan intracelularmente a través de moléculas conocidas como segundos mensajeros, entre los cuales encontramos nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc), Ca^{2+} , diacilglicerol, fosfoinosítidos y metabolitos del ácido araquidónico. Los segundos mensajeros son reconocidos por proteínas que adquieren la propiedad de modular a otras proteínas específicas.

2.1. Vía de las MAP quinasas

Dentro de los mecanismos moleculares que controlan diversas vías de transducción de señales en mamíferos tiene un rol preponderante la superfamilia de GTPasas monoméricas Ras, involucradas en el control del crecimiento celular y la diferenciación. Las proteínas Ras oscilan en la célula entre una forma inactiva unida a GDP y una forma activa unida a GTP. La conversión de la forma activa a la forma inactiva es mediada por una actividad GTPasa intrínseca. Las mutaciones que anulan esta actividad llevan a la activación constitutiva de las proteínas Ras induciendo la transformación celular. En células de mamíferos la forma activa de las proteínas Ras es capaz de estimular la cascada de MAP quinasas (Mitogen Activated Protein Kinases) (Avruch y col., 1994).

En *S. cerevisiae* existen 2 proteínas Ras funcionalmente homólogas, Ras1p y Ras2p (Toda y col. 1985). Las células de *S. cerevisiae* carentes de ambas formas de Ras no son viables, hecho que se ha atribuido al rol de Ras en la estimulación de la vía del AMPc, esencial para la progresión del ciclo celular a nivel de la fase G1 (Toda y col., 1985). Las proteínas Ras tienen además la capacidad de activar la cascada de MAP quinasas. Esta cascada se requiere en la transición morfológica levadura-pseudohifa (Gimeno y col., 1992; Mösch y col., 1996).

2.2. Vía del AMPc

Como se mencionó anteriormente, algunos estímulos externos operan intracelularmente a través de moléculas conocidas como segundos mensajeros. El AMPc es uno de estos segundos mensajeros y está involucrado en la transducción de una gran cantidad de señales extracelulares en organismos eucariotas.

El sendero del AMPc comprende fundamentalmente un receptor de la señal extracelular, una proteína transductora (proteína G_s) y la enzima (adenilato ciclasa), la cual una vez activada por la proteína G_s es responsable de la síntesis de AMPc. Las proteínas G triméricas en su forma inactiva están formados por la subunidad α unida a GDP, y un complejo formado por las subunidades β y γ asociadas. El proceso de activación del sendero se produce por unión de un ligando agonista a su receptor (ver Figura 2), que promueve el intercambio del GDP unido a G_α por GTP. La unión de GTP produce cambios conformacionales en la subunidad α que provocan su disociación del dímero $\beta\gamma$ y consecuentemente su activación. Este estado se mantiene hasta que el GTP es hidrolizado a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de G_α ; G_α -GDP se puede reasociar con las subunidades $\beta\gamma$ volviendo así al estado basal inactivo (Gilman, 1987). La subunidad G_α activada (G_α -GTP) estimula a la adenilato ciclasa y como consecuencia aumenta el nivel intracelular de AMPc. La actividad de la adenilato ciclasa puede ser inhibida a través de un mecanismo en que intervienen proteínas G inhibitorias (G_i) pertenecientes también a la superfamilia de las proteínas G triméricas.

El AMPc puede cumplir diversas funciones dentro de la célula, ya sea modulando el sendero de MAP quinasas a través de su unión a Epac (Exchange protein activated by cAMP), uniéndose y regulando la función de una familia de canales iónicos, o mediando la activación de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc (PKA). La activación de la PKA resulta en la fosforilación de numerosas proteínas tanto estructurales como regulatorias que participan en diferentes caminos metabólicos (Fimia y Sassone-Corsi, 2001).

Para el cierre de este proceso de transducción de señales existen varios mecanismos conocidos: uno es la hidrólisis o recaptación de la hormona que originó la señal, otro es el bloqueo de la recepción de la señal

a nivel del receptor ya sea por degradación o por internalización del mismo haciéndose inaccesible al agonista, o bien la hidrólisis del segundo mensajero llevada a cabo por la fosfodiesterasa de AMPc. Por otro lado, las fosfatasa de proteínas encargadas de remover el grupo fosfato de las proteínas fosforiladas vuelven a las proteínas a su estado basal. Este sistema de regulación provee a la célula de un mecanismo de control eficiente, flexible y sensible dándole la posibilidad de responder a señales del medio a través de la modificación de sus funciones metabólicas.

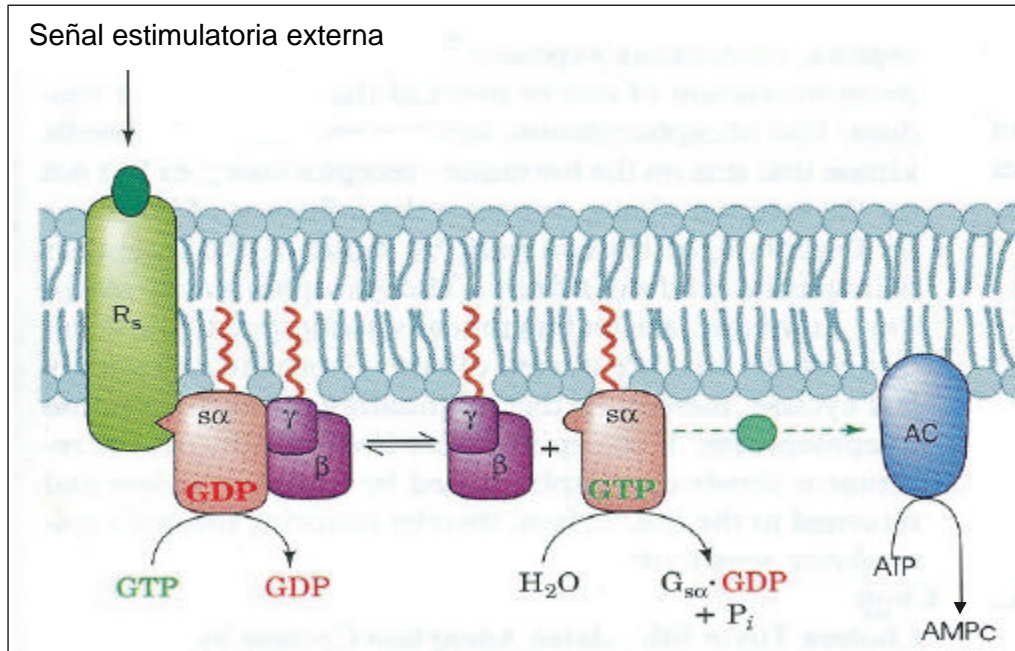


Figura 2. Regulación de la adenilato ciclasa en mamíferos. La recepción de una señal estimuladora por parte del receptor (R_s) asociado a la proteína G_s , produce su activación y ésta a su vez activa a la adenilato ciclasa (AC) que cataliza la producción de AMPc.

El mecanismo de señalización AMPc/PKA opera tanto en organismos eucariotas superiores como en inferiores. En *S. cerevisiae* se ha demostrado la existencia de las proteínas componentes de este sendero y se ha establecido la ubicación relativa de las mismas dentro del camino de transducción de señales. Los resultados obtenidos en *S. cerevisiae* han servido de base para el estudio del sendero del AMPc/PKA en otros hongos, entre ellos *C. albicans*.

2.3. Transducción de señales y dimorfismo en *C. albicans*

Como ya se mencionó en el ítem 1, la funcionalidad de muchos genes en *C. albicans* se estableció en base al conocimiento previo acumulado en el estudio de *S. cerevisiae*.

Las vías de transducción de señales relacionadas con el dimorfismo en *C. albicans* son complejas y parecen no ser completamente independientes una de la otra. A nivel de proteínas transductoras, se ha identificado una proteína homóloga a Ras1p, CaRas1p. CaRas1p no es esencial para la supervivencia de las células de *C. albicans*, pero su eliminación provoca un marcado defecto en la formación de hifas verdaderas en respuesta a suero y a otras condiciones (Feng y col., 1999). Más recientemente se ha demostrado que CaRas1p es parte tanto del sendero de MAP quinasas como del de AMPc/PKA (Leberer y col., 2001).

Otras proteínas transductoras implicadas en el crecimiento pseudohifal de *S. cerevisiae* y pertenecientes al sendero de MAP quinasas, han encontrado su homólogo en *C. albicans*. Este es el caso de Cdc42p que pertenece también a la superfamilia Ras. La función de Cdc42p en *C. albicans* parece ser importante en el crecimiento polarizado tanto de las células levaduriformes como de la forma filamentosa. Teniendo en cuenta la homología funcional con Cdc42p de *S. cerevisiae* se ha propuesto la ubicación de CaCdc42p en un paso previo a la cascada de las MAP quinasas (Ushinsky y col., 2002).

Recientemente se ha encontrado en *C. albicans* el gen *GPA2* que codifica para un homólogo de la subunidad α de una proteína G (Sanchez-Martinez y Perez-Martin, 2002). Células de *C. albicans* nulas para el gen *GPA2* muestran defectos en la transición morfogénica en respuesta a diversas condiciones, pero no en respuesta a suero. Estos defectos no son revertidos por la adición exógena de AMPc. Se ha encontrado evidencia de que el producto del gen *GPA2* es requerido para la regulación de la vía de señalización de MAP quinasas (Sanchez-Martinez y Perez-Martin, 2002).

En *C. albicans* la respuesta al pH está mediada por una vía de transducción de señales conservada en otros hongos. Como ocurre en *S. cerevisiae* y en *Aspergillus nidulans* la proteólisis del factor de transcripción *RIM101* (*PRR2*) media la respuesta por pH (Ramon y col., 1999).

El último paso de las cascadas AMPc/PKA y pH implica la activación de Cph1 y Efg1, que estimulan la transcripción de genes específicos involucrados en la diferenciación. En la Figura 3 se esquematizan las cascadas de quinasas descritas anteriormente y su rol en la diferenciación.

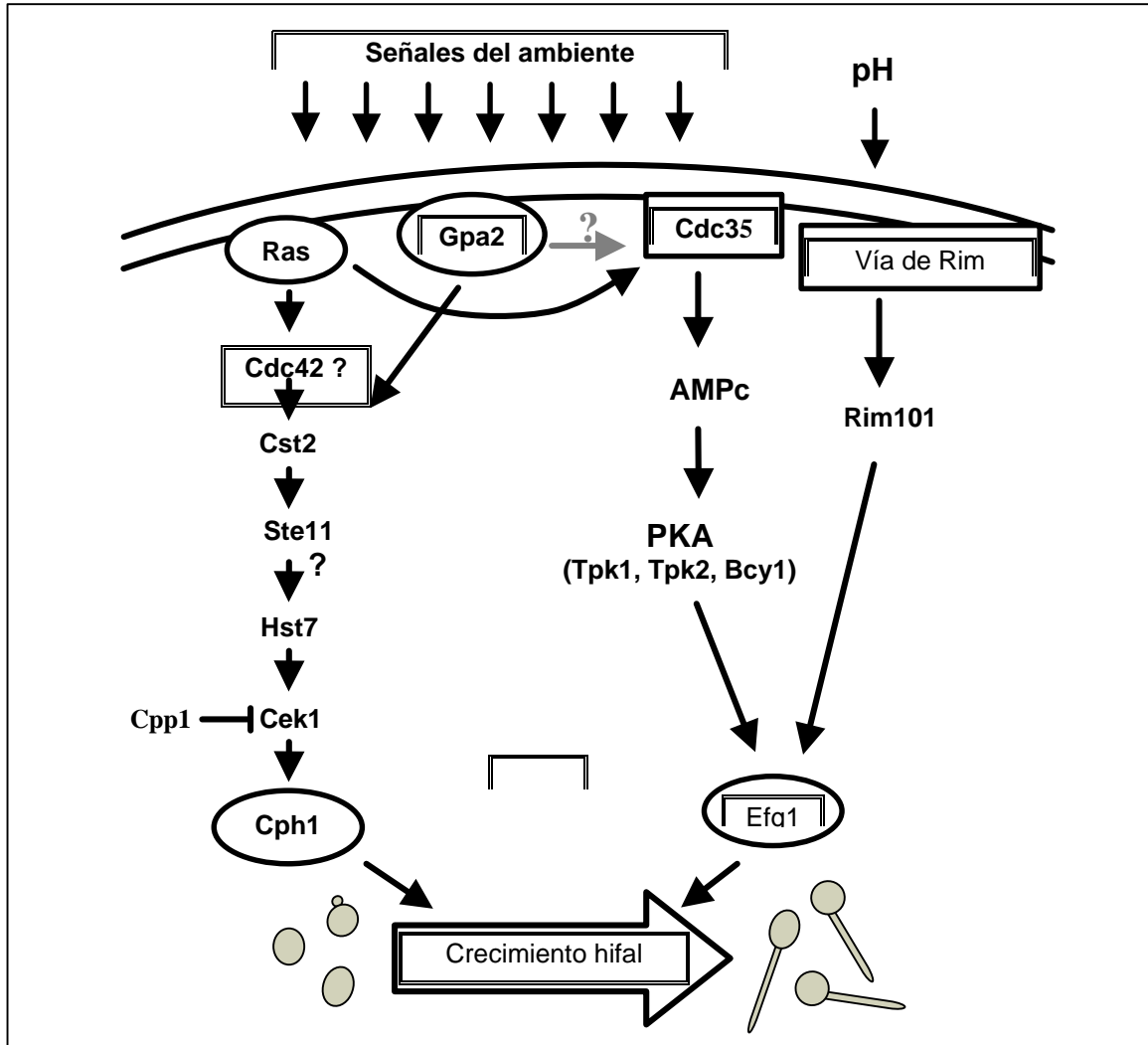


Figura 3. Vías de señalización en *C. albicans*. Componentes conocidos de la vía de las MAP quinasas, de la vía de AMPc/PKA y de la vía de Rim101.

3. Quinasas de proteínas

Las quinasas de proteínas pueden ser clasificadas en dos grandes grupos según el aminoácido que fosforilan: aquellas que transfieren el grupo fosfato del ATP a los aminoácidos serina o treonina (Ser/Thr quinasas) y aquellas que lo transfieren al aminoácido tirosina (Tyr quinasas). Existe un tercer grupo, las histidina-aspártico quinasas, que se autofosforilan en residuos de histidina y le transfieren este fosfato a un residuo de aspártico.

Dentro del primer grupo se incluyen: quinasa dependiente de AMPc (PKA), quinasa dependiente de GMPc (PKG), PKC, quinasa dependiente de Ca²⁺-calmodulina (CaMK), quinasas de proteínas CK1 y CK2, quinasas dependientes de ciclinas (CDK), Raf quinasa, MAPK y quinasa dependiente de DNA (DNA.PK).

Entre las quinasas que fosforilan residuos de tirosina está la Src, los receptores tirosina quinasa como el receptor de insulina, los receptores de factores de crecimiento como EGF y PDGF y las tirosinas quinasas citoplasmáticas como la quinasa Abl tipo I.

A excepción de las enzimas oncogénicas, todas las quinasas de proteínas son enzimas altamente reguladas y son activadas o desactivadas en respuesta a señales muy diversas.

4. Quinasa de proteínas dependiente de AMPc

La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo clave, que afecta casi todos los aspectos del crecimiento y la homeostasis en células eucariotas. La primera demostración de que la fosforilación regulaba la actividad de una enzima fue la de la glucógeno fosforilasa en respuesta a glucagón (Fischer y Krebs, 1955; Sutherland y Wosiliat, 1955). El paso siguiente fue la identificación de un factor termoestable que mediaba el efecto del glucagón: el 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (Sutherland & Rall, 1958). Así comenzó a desarrollarse el concepto de que el AMPc era el segundo mensajero intracelular de un amplio rango de hormonas, neurotransmisores y de otros caminos de señalización celular. Posteriormente se purificó una quinasa de proteínas regulada por AMPc que es el blanco intracelular principal de este nucleótido cíclico: la PKA (EC 2.7.1.37). (Walsh y col., 1968)

Dentro de la familia de quinasas de proteínas, la PKA es un caso especial, ya que es la única regulada por interacción con una subunidad disociable y distinta de la subunidad catalítica; ésta última es además, una de las subunidades catalíticas más simples de las quinasas de proteínas (Taylor & Radzio-Andzem, 1994).

La PKA es un tetrámero formado por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C); esta holoenzima tetramérica es prácticamente inactiva. La subunidad regulatoria posee dos sitios de unión al AMPc; la unión de este nucleótido a R es cooperativa y altera su afinidad por la subunidad C promoviendo la disociación de la holoenzima en un dímero de subunidad regulatoria con cuatro moléculas de AMPc unidas y dos subunidades catalíticas monoméricas catalíticamente activas que fosforilan sustratos proteicos específicos en residuos serina o treonina (Figura 4).

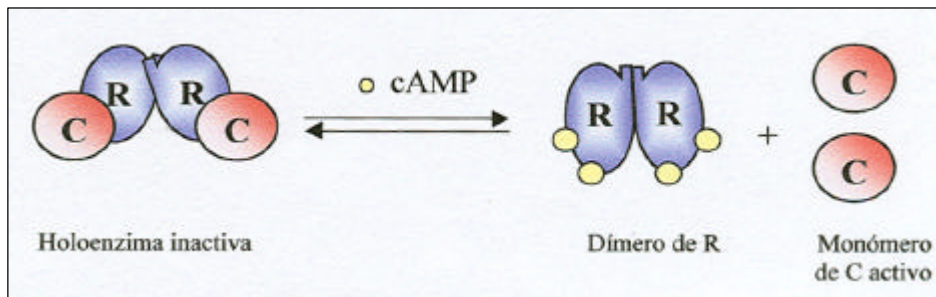


Figura 4. Mecanismo de activación de la holoenzima PKA por AMPc

4.1. Características bioquímicas y estructurales de PKA

Inicialmente se identificaron dos isoenzimas de PKA en función del orden de elución de una columna de DEAE celulosa y se las nombró isoformas I y II (Beavo y col., 1974; Rubin y col., 1974). Más adelante se demostró que ambas isoformas se diferenciaban en el tipo de subunidad regulatoria que integraba la holoenzima mientras que las subunidades catalíticas pueden ser cualesquiera de las isoformas que se describen más adelante (ítem 4.3.2).

Para la mayoría de las PKAs caracterizadas, la masa molecular para la subunidad C es de alrededor de 40 kDa, la de RI 49 kDa y la de RII 55 kDa; la masa molecular estimada para las holoenzimas I y II es de aproximadamente 180-200 kDa que corresponde a los respectivos tetrámeros RI₂C₂ y RII₂C₂.

La PKA transfiere el grupo fosfato γ del ATP a residuos serina o treonina de diferentes sustratos proteicos. La PKA reconoce en los sustratos una secuencia consenso que se caracteriza por la presencia de arginina (usualmente dos) y hacia el extremo C-terminal, el grupo aceptor (serina o treonina) separado por uno o dos residuos de cualquier clase (x); también se suele encontrar un residuo hidrofóbico hacia el extremo C-terminal del grupo aceptor de fosfato. Las secuencias consenso de la PKA se pueden, por lo tanto, representar: R-R-x-S/T y R-x-S/T. Existen otros factores que influyen en el reconocimiento de la enzima como ser: características estructurales de los sustratos y residuos que resulten espacialmente cercanos al sitio consenso. Para la medición de la actividad fosfotransferasa de las quinasas de proteínas se utilizan péptidos que contienen la secuencia canónica respectiva; en el caso de la PKA se utiliza el kemptido, heptapéptido sintético, que contiene el sitio de fosforilación de la piruvato quinasa de hígado porcino, LRRASLG, (Kemp y col., 1977). El reemplazo de un aminoácido fosforilable por otro aminoácido no fosforilable, como alanina, a menudo resulta en pseudosustratos que se unen a la enzima pero no pueden ser fosforilados, y en consecuencia actúan como inhibidores competitivos. Proteínas que contengan estas

secuencias «pseudosustrato» podrían contribuir a la regulación de la enzima *in vivo* como es el caso de la propia subunidad regulatoria (ver más adelante ítem 4.4), o del inhibidor termoestable específico (ver 4.6) los cuales poseen una capacidad inhibitoria de la enzima en el rango nanomolar.

Por otro lado, el ATP debe estar formando un complejo con Mg^{2+} para que su fosfato α sea transferido al sustrato proteico. En presencia de Mg^{2+} la K_m para el ATP es usualmente alrededor de 10 μM .

4.2. Subunidad catalítica

4.2.1. Estructura de la subunidad catalítica

Se han identificado tres isoformas de la subunidad catalítica en tejidos de mamíferos Cá, C α y C β . En vista de la multitud de efectos biológicos mediados por el AMPc, la idea de que diferentes isoformas de C puedan mediar diferentes funciones celulares parece apropiada para explicar su rol en el metabolismo celular, de hecho, cada vez más trabajos muestran que determinadas funciones son propias de una determinada isoforma.

Las isoformas α y β presentan más del 90% de identidad a nivel aminoacídico (Shoji y col. 1983, Lee y col. 1983). La isoforma Cá se expresa constitutivamente en todos los tejidos, mientras que la C α es tejido específica (Hedin y col. 1987). Una tercera isoforma, C β hallada solo en testículo humano, diverge de Cá y C α humanas en un 17% y 21% respectivamente a nivel de su secuencia aminoacídica (Beebe y col. 1990).

La resolución de la estructura de la subunidad catalítica de la PKA formando un complejo binario con el péptido inhibidor y ternario con pseudosustratos y nucleótidos, permitió conocer su conformación en la forma activa (Bossenmeyer y col., 1993). La estructura cristalina de PKA sirvió como modelo para el análisis de la gran familia de las quinasas de proteínas y permitió ahondar en los mecanismos de acción, los roles de los residuos conservados y los aspectos regulatorios de las mismas.

La estructura terciaria de la subunidad catalítica consiste en dos estructuras lobulares separadas por un surco que es ocupado por el sustrato. El lóbulo pequeño participa de la unión de ATP- Mg^{2+} mientras que el lóbulo mayor está asociado con el reconocimiento peptídico y la actividad catalítica.

En la Figura 5 se muestra el esquema de módulos correspondiente a Cá de mamíferos. La subunidad catalítica contiene una región de aproximadamente 250 aminoácidos, común a todas las proteínas quinasas, zona que es conocida como núcleo catalítico (Hanks y col., 1988).

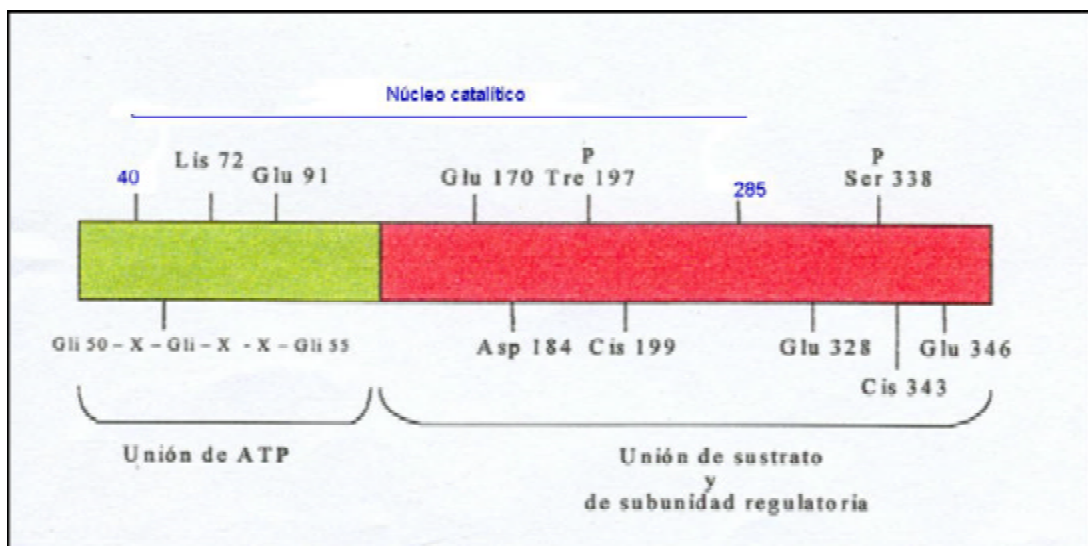


Figura 5. Subunidad catalítica de la PKA. Estructura de dominios correspondiente a Cá bovina

Esta región está comprendida entre los residuos 40 a 285, y contiene varias secuencias conservadas; dentro de este núcleo se pueden identificar residuos y regiones que son esenciales para la actividad catalítica, para la unión de ATP- Mg^{2+} y para la unión del sustrato.

A. Sitio de unión de ATP

Para que ocurra la catálisis la subunidad catalítica debe unir los dos sustratos, péptido y ATP. Ambos se unen con alta afinidad a sitios diferentes en la subunidad catalítica.

El ATP se une a un sitio ubicado en la región amino terminal de C; mediante mutagénesis dirigida y modificaciones químicas de la proteína se identificó en este dominio a la Lis72 como funcionalmente impor-

tante (Zoller y Taylor, 1979). El núcleo catalítico de todas las quinasas de proteína contiene una Lis o Arg invariante correspondiente al sitio Lis72 de Cá y que interactúa con el fosfato γ del ATP. Se confirmó asimismo que la zona flanqueante a este residuo también es importante en la unión a ATP.

También participan grupos carboxilo en la unión de ATP; estos grupos unen Mg^{2+} , formando un complejo ternario con el ATP- Mg^{2+} . (Granot y col., 1980)

B. Sitio de unión del sustrato y actividad fosfotransferasa

Como ya se describió, la subunidad catalítica reconoce en los sustratos secuencias que contienen dos aminoácidos básicos, casi siempre arginina, separados por uno o dos residuos de la serina o treonina que es fosforilada. Grupos carboxilo de los aminoácidos espacialmente cercanos participan en el reconocimiento y transferencia de fosfato al sustrato peptídico. Se demostró que Glu170 y un grupo de varios residuos básicos que se encuentran en el extremo carboxilo terminal de la molécula, participan en el reconocimiento del sustrato (Buechler y Taylor, 1990). Cis199, Glu346 y Tre197 formarían también parte del sitio activo (Mobashery y Kaiser, 1988). Este último residuo tiene un interés particular ya que su fosforilación es condicionante para la actividad catalítica.

Actualmente se le asigna un rol importante a His87 no sólo por la interacción con los sustratos sino también por la interacción con R.

C. Modificaciones post-traduccionales de la subunidad catalítica

En la subunidad catalítica ocurren dos modificaciones post-traduccionales, por un lado la Gly amino-terminal es miristoilada y por otro, esta subunidad es fosforilada en dos sitios.

A diferencia de proteínas como las quinasas de la familia *src*, donde el grupo miristoilo confiere la capacidad de asociarse a membrana, en el caso de la subunidad C de la PKA estabiliza su estructura secundaria. El grupo acilo se pliega dentro de la proteína estableciendo contactos importantes con varias regiones distintas de la cadena polipeptídica (Zheng y col., 1993).

Del análisis cristalográfico del complejo binario formado por la subunidad C y el péptido inhibidor surge que el fosfato de Tre197 es el principal sitio de contacto directo entre los dos lóbulos anteriormente mencionados. Esta fosfotreonina es necesaria no solo para el reconocimiento del sustrato, sino también para la interacción con la subunidad regulatoria de la quinasa (Levin y col., 1988). Se ha demostrado que esta fosforilación es el resultado de autofosforilación y que es un paso crítico para la activación de C. Haciendo sustituciones de este aminoácido por Asp o Glu se demostró que era necesario que en la posición de la treonina hubiera un grupo cargado negativamente para que ocurriera la unión con la R (Levin y Zoller, 1990). Se postula que esta fosforilación provocaría cambios importantes para generar el estado conformacional activo de muchas proteínas quinasas (Zheng y col., 1993).

4.2.2. Subunidad catalítica en eucariotas inferiores

Se ha caracterizado la subunidad C en eucariotas inferiores tales como *S. cerevisiae* y *Dyctiostelium discoideum* (Gross y col. 1990; Anjard y col. 1993). Se han encontrado diferencias tanto en la zona carboxi como amino terminal con respecto a sus homólogos en eucariotas superiores; en el caso de *S. cerevisiae* se han encontrado tres genes diferentes (*TPK1*, *TPK2* y *TPK3*) que codifican para otras tantas subunidades C (Toda y col., 1987); en *D. discoideum*, la subunidad C posee un segmento amino terminal extra de 332 aminoácidos que le otorga una masa molecular inusualmente elevada (73 kDa).

4.3. Subunidad regulatoria

La subunidad regulatoria de la PKA es el principal receptor intracelular de AMPc descrito hasta ahora. Como se mencionó en el ítem 2.2 otros mediadores de los efectos del nucleótido cíclico en eucariotas son el receptor superficial de AMPc en *D. discoideum*, algunos canales iónicos y la proteína Epac.

Como se comentó anteriormente (ítem 4.1) basándose en el patrón de elución en columnas de DEAE celulosa, se identificaron dos isoformas de la subunidad regulatoria, denominadas tipo I y II. En los últimos años, con la utilización de técnicas de Biología Molecular se encontró que existe aún mayor heterogeneidad en las subunidades regulatorias lo que permite esperar la formación, *in vivo*, de múltiples isoenzimas entre estas y las diversas isoformas de C ya descritas.

En eucariotas superiores se han clonado isoformas de cada tipo de R: RIá (Lee y col., 1983) y RIIá (Scott y col., 1987), que se expresan en la mayoría de los tipos celulares, aunque varían las proporciones relativas de cada una y por otro lado RIâ (Clegg y col., 1988) y RIIâ (Jahnsen y col., 1986) que son más específicas de tejido. La expresión de algunas isoformas parece ser constitutiva y la de otras, inducible. Recientemente se ha demostrado la existencia de variantes de la especie RIá, producto de maduración alternativa de un ARNm («splicing alternativo») (Skålhegg y Tasken, 1997). Tanto la subunidad RI como la RII son fosforiladas

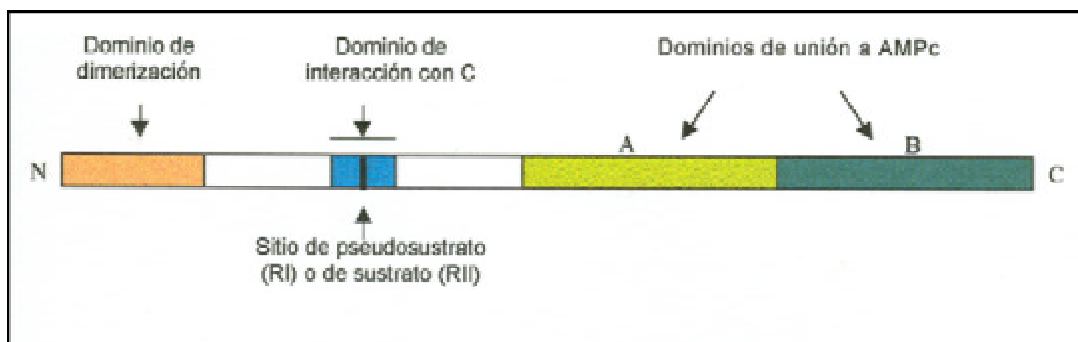
por otras quinasas de proteínas; la RI es fosforilada por PKG en una Ser próxima al sitio de pseudosustrato (Hashimoto y col., 1981) y la RII tiene cuatro sitios de fosforilación más que están entre los residuos 44 y 76, que son fosforilados por la glucógeno sintetasa quinasa y la caseína quinasa II (Hemmings y col., 1982).

4.3.1. Estructura de dominios de la subunidad regulatoria

La subunidad regulatoria tiene estructura de dímero muy asimétrico, esta asimetría parece mantenerse también en la holoenzima (Zhao y col., 1998). La estructura de dominios de la subunidad regulatoria incluye:

- A. dominio de dimerización
- B. región bisagra (incluye secuencia de pseudosustrato en RI /sustrato en RII)
- C. dominio de unión a AMPc

En la Figura 6 se muestra un esquema de la organización de los dominios en R



Regulatoria. Dominios funcionales

A. Dimerización de la subunidad R

La subunidad regulatoria forma un dímero estable, que permanece intacto luego de la liberación de las subunidades catalíticas. Las únicas subunidades regulatorias que no forman dímeros son las de *D. discoideum* (Mutzel y col., 1987) y *Saccharomyces cerevisiae* (Silberstein y col., 1990).

En RI, los monómeros están unidos covalentemente por puentes disulfuro formados entre los residuos Cis15 y Cis37 (Zick y Taylor, 1982). La dimerización de RII no involucra cisteínas, sino que es mantenida por interacciones entre los residuos del extremo amino-terminal. Se determinó que el dominio de dimerización en RII está localizado entre los residuos 1-30 (Scott y col., 1990).

B. Región bisagra. Interacción con la subunidad C

En ausencia total de AMPc la subunidad R inhibe la actividad de la subunidad C. La región esencial para la interacción con la subunidad C, es la región conocida como «bisagra», que se encuentra entre los residuos 90 y 100 en la subunidad regulatoria. Esta zona es sensible al clivaje proteolítico, en particular por tripsina, y está protegida cuando la R forma parte de la holoenzima. Las secuencias presentes en esta región son semejantes a las presentes en los sustratos que son fosforilados por la subunidad C y en RII son fosforiladas en Ser por la misma subunidad catalítica en una reacción intramolecular (Rangel-Aldo y Rosen, 1977; Takio y col., 1984). La subunidad RI posee, en esta región, una secuencia de pseudosustrato o pseudofosforilación Arg-Arg-Gly-**Ala**/Gly-Ile-Ser en la cual la posición Ser fosforilable está reemplazada por Ala o Gly.

La proteólisis del extremo amino-terminal no impide la unión a C mientras se mantengan las Arg; por mutagénesis dirigida se demostró que por lo menos una de las dos argininas conservadas en la región «bisagra» es necesaria para la unión estable entre R y C (Buechler y col., 1993).

C. Unión a AMPc

Cada monómero de R posee dos sitios de unión de AMPc, localizados a continuación del sitio de dimerización y la región de pseudosustrato. Estos sitios son denominados sitio A y sitio B, y son el resultado de un proceso de duplicación génica (Shabb y Corbin, 1992). Ambos sitios tienen diferentes velocidades de intercambio de AMPc y actúan de manera sinérgica durante la activación de PKA (Døskeland y Øgreid, 1984). Cada dominio de unión de AMPc está formado por tres hélices α y ocho hojas β , que se distribuyen espacialmente para formar un bolsillo en el cual se une el nucleótido cíclico.

En la holoenzima, la unión de AMPc al sitio B aumenta la afinidad del sitio A por este nucleótido. Por lo tanto la unión a un sitio aumenta la probabilidad de unión estable del nucleótido al otro sitio y una vez que ambos sitios han sido ocupados formando el complejo $R_2C_2(AMPc)_4$, la subunidad C se disocia de R.

4.4. Análisis de la interacción R/C

Como se comentó más arriba la interacción entre las subunidades de la PKA se establece entre el dominio de interacción de R que contiene el módulo de sustrato o de pseudosustrato y el sitio de unión del sustrato en C; de esta forma, en la holoenzima, R bloquea la entrada de sustrato al sitio activo de C (Taylor y col., 1992).

El dominio inhibitorio de ambos tipos de R contiene las dos argininas fundamentales para el reconocimiento de la PKA y como se mencionó anteriormente, el sitio resulta fosforilado en caso de tratarse de la subunidad RII. Esta fosforilación no produce disociación de la holoenzima como podría esperarse para un verdadero producto fosforilado, pero disminuye la afinidad de R por C en un orden de magnitud. Este hecho, agregado a que oligopéptidos que tienen la secuencia de pseudosustrato sean débiles inhibidores de C, hace pensar que otros elementos estructurales de R deben tener un papel relevante en su interacción con C.

En mamíferos, la afinidad de los dos tipos de R por C disminuye 1000 veces en presencia de AMPc. En *S. cerevisiae* la afinidad aparente entre R y C disminuye sólo 20 veces por el agregado de AMPc. Si la interacción entre R y C solo dependiera de la presencia de AMPc, a concentraciones fisiológicas de AMPc (0.25 μ M) y de enzima, (0.2-0.7 μ M) ésta estaría completamente disociada lo que apoya la idea de que existen, *in vivo*, otros requerimientos para la disociación de la holoenzima.

La Figura 7 muestra, a modo de resumen, un esquema de la estructura de la holoenzima y su disociación en la se han incorporado, respecto del esquema mostrado en la Fig. 4, algunos detalles aportados por nuevos estudios estructurales. Se destacan en este esquema la interacción de las subunidades C con determinados «loops» de la cadena polipeptídica de las subunidades R que mantienen la estructura de C en una conformación cerrada, semejante a la que adquiere en presencia de sus sustratos, y los cambios promovidos en R y C por la unión de AMPc que llevan a la disociación. La subunidad C en su forma libre, ahora activa, presenta una conformación abierta que puede interactuar con sus sustratos.

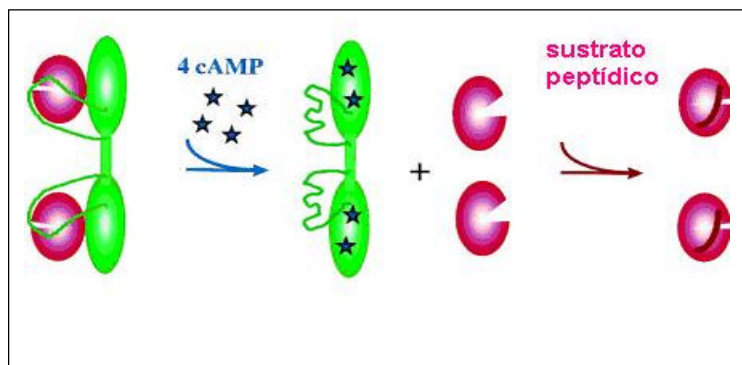


Figura 7. Activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc. Modelo de la activación, teniendo en cuenta las conformaciones abierta y cerrada, la relación entre las subunidades C libres, el dímero de subunidades R y la holoenzima intacta (Zhao y col., 1998).

El modelo de disociación de la PKA por AMPc que se muestra en la Figura 7, está sustentado por una cantidad de experimentos realizados *in vitro* con concentraciones de enzima muy inferiores de las que existen en la célula. Recientemente han surgido evidencias que llevan a reconsiderar algunos aspectos de este mecanismo. Experimentos realizados utilizando técnicas de transferencia de energía de resonancia (FRET) indican que no es suficiente la presencia de altas concentraciones de AMPc para disociar la enzima de tipo II (Yang y col., 1995). A su vez Vigil y col. (2004) demostraron utilizando el método SAXS, (small-angle X-ray scattering) que el agregado de un exceso molar de AMPc a la enzima de tipo I promueve solo la activación parcial de la misma que se completa recién con el agregado del sustrato peptídico; este efecto es menor en la enzima tipo II manteniéndose un porcentaje significativo de esta holoenzima sin disociar. En el mismo sentido, recientemente, Viste y col. (2005) demostraron que los sustratos aumentan la disociación de la PKA tipo I a concentraciones fisiológicas bajas de AMPc pero no ocurre lo mismo con la enzima tipo II. Lo relevante de estos últimos estudios reside en que sustentan la hipótesis de que la disponibilidad de sustratos contribuiría a la regulación fina de la activación diferencial de las enzimas tipo I y tipo II.

4.5. Inhibidor específico de la PKA: PKI

Poco tiempo después del descubrimiento de la PKA, Walsh y col. (1971) informaron el hallazgo de una proteína estable al ácido y al calor, con la capacidad de inhibir específicamente a la PKA ($K_i \sim 2nM$). Dada

la gran eficacia de este inhibidor, resultó una herramienta muy útil en el estudio de la implicancia de la PKA en mecanismos regulatorios.

Se encontró que existen dos conformeros del PKI. La cadena polipeptídica del PKI contiene 75 aminoácidos y su dominio inhibitorio está ubicado cerca del extremo amino terminal (Scott y col., 1985). Como en el caso de la subunidad RI, su capacidad inhibitoria está basada en la existencia de un sitio de pseudosustrato. Habitualmente se utilizan péptidos con 20 aminoácidos que comprenden los residuos 5 a 24 de la proteína inhibitoria que siguen siendo potentes inhibidores y conservan la especificidad de la molécula nativa.

La elevada capacidad inhibitoria del PKI depende de la presencia de ATP-Mg²⁺, y actúa como un inhibidor competitivo con respecto a sustratos peptídicos (Whitehouse y Walsh, 1983). La unión de R y PKI son mutuamente excluyentes. El inhibidor bloquea la catálisis al interactuar con el complejo subunidad C / ATP-Mg²⁺ en la misma forma que lo hace RI. Se postula que la alta afinidad del inhibidor se debe al establecimiento de un alto número de interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y puentes de H con el sitio activo de C y que elementos de su estructura secundaria ayudarían en la formación y estabilidad de dichas interacciones.

5. Localización subcelular de la PKA

5.1. Proteínas de anclaje

Dado que la PKA está involucrada en numerosas cascadas de señalización paralelas, es importante comprender cómo la quinasa es activada en las células en el lugar y el momento adecuados. En mamíferos, la especificidad está dada en parte por la compartimentalización subcelular de la enzima a través de la interacción con distintas proteínas de unión denominadas AKAPs (A Kinase Anchoring Proteins).

Se han identificado más de 25 AKAPs, algunas de las cuales son productos de una compleja familia de genes que varían en el procesamiento de su ARNm (Colledge y Scott, 1999). Las AKAPs inmovilizan la PKA a través de su interacción con las subunidades RI y RII de la PKA. Poseen un sitio de unión a R y una secuencia que dirige al complejo PKA-AKAP a determinados compartimientos celulares ya sea por interacción proteína-proteína que lo ubica en elementos estructurales o por interacción lípido-proteína que lo ancla en las membranas.

El módulo molecular que media la unión AKAP con RII está altamente conservado; la secuencia de aminoácidos en este módulo es tal que adopta la estructura de una hélice anfipática, con residuos hidrofóbicos alineados a lo largo de una de las caras de la hélice y residuos cargados a lo largo de la otra cara (Carr y col., 1991). Los primeros 30 aminoácidos de RII participan en la unión a AKAP y promueven la dimerización de las subunidades RII, prerequisite para la unión a una AKAP (Hausken y col., 1996). Aunque la mayoría de los estudios de las AKAPs fueron enfocados a su interacción con la subunidad RII de la PKA, se han encontrado tres AKAPs que se asocian a subunidades RI (Huang y col., 1997). Algunas AKAPs tienen la capacidad de asociarse con otras quinasas y fosfatasa formando un complejo transductor de señales, como se muestra en la Figura 8 para la AKAP79.

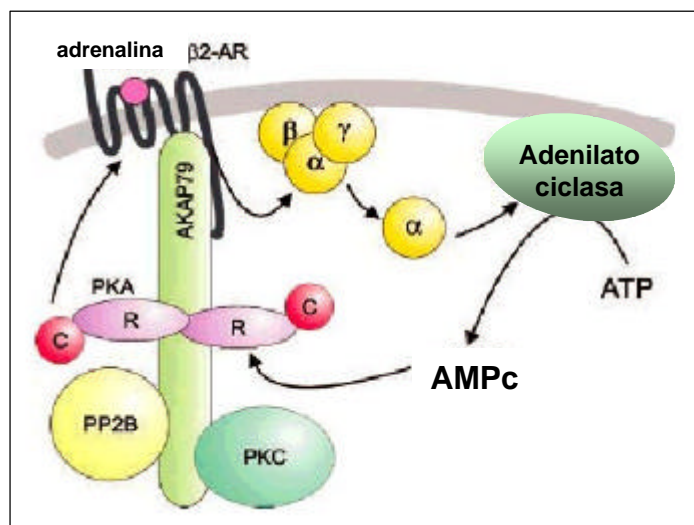


Figura 8. Localización de la PKA en eucariotas superiores. Se muestra la interacción de AKAP79 con dos quinasas de proteínas (PKA y PKC) y una fosfatasa de proteínas (PP2B). (Griffioen y Thevelein, 2002).

5.2. Translocación al núcleo

Con respecto a la localización subcelular de las subunidades de la PKA una vez disociada la holoenzima se ha demostrado, en eucariotas superiores, que la subunidad C se transloca al núcleo mientras que la subunidad R permanece en el citoplasma. Cuando se microinyecta en el citoplasma subunidad C marcada con un fluorocromo se observa que también se transloca rápidamente al núcleo (Fantozzi y col, 1992). El mecanismo de translocación no se conoce con exactitud; la mayoría de las proteínas con destino nuclear poseen secuencias específicas de localización que no fueron detectadas en C. En eucariotas superiores se sabe que la actividad de la PKA es regulada negativamente por el inhibidor termoestable específico PKI además de serlo por la subunidad R. El PKI también ingresa al núcleo y se propone que podría actuar como una chaperona en la exportación nuclear de la subunidad C regulando de éste modo, la disponibilidad de PKA en el núcleo (Fimia y Sassone-Corsi, 2001).

Si bien no se puede descartar la posibilidad de que la subunidad C tenga influencia en eventos nucleares en forma indirecta mediante la fosforilación en el citoplasma de factores que luego puedan ser transportados al núcleo, la translocación de C al núcleo representa en sí un importante paso en la transducción de señales que regulan la actividad génica (Nigg, 1990) control transcripcional de la expresión de genes involucra interacciones proteína-ADN y proteína-proteína. En células eucariotas la respuesta transcripcional a un aumento en los niveles de AMPc producido por diferentes estímulos es mediada por una familia de secuencias específicas en el ADN llamadas secuencias CRE, que se encuentran ubicadas en la región promotora de varios genes y contienen la secuencia consenso TGACGTCA (Borrelli y col, 1992). A su vez, en células que responden al AMPc se encontró un grupo de proteínas (CREB, CREM) que se unen a esas secuencias. Se encontró que CREB fosforilada por la subunidad C estimula la transcripción de genes que responden al AMPc. La estequiometría y la cinética de fosforilación de CREB están estrechamente correlacionadas con la entrada de C al núcleo (Hagiwara y col, 1993).

6. Control de la PKA *in vivo*

Aparte de la recientemente propuesta función de los sustratos en la regulación de la disociación de la PKA, existen otros factores a los que se les adjudica un posible rol fisiológico en el control de la PKA *in vivo*.

Balance entre las subunidades R y C. La concentración intracelular de la PKA es alrededor de 0.2-0.7 μ M y la relación molar entre las subunidades R y C es usualmente 1:1, aunque en ciertas circunstancias puede alterarse (Beebe y Corbin, 1986). Por otro lado, la relación molar holoenzima tipo I / tipo II varía no solo con el tejido, sino que puede cambiar en el mismo tejido durante el desarrollo, crecimiento, diferenciación celular, procesos de transformación maligna, etc.

El balance entre las cantidades de R y C ha sido objeto de numerosos estudios ya que podría ser uno de los mecanismos que la célula utiliza para regular la actividad de la PKA en distintas circunstancias.

Se ha demostrado que la sobreexpresión del ADN copia que codifica para la subunidad C provoca un aumento en la traducción de la subunidad RI sin que varíe la cantidad de RII (Uhler y McKnight, 1987). Este resultado sugiere que la sobreproducción de RI puede representar un mecanismo al que apela la célula para neutralizar el exceso de subunidad C libre.

Inhibición por PKI. Otra herramienta que podría utilizar la célula para controlar la actividad de PKA es el PKI. En músculo esquelético la cantidad de PKI es suficiente para inhibir el 20% de la subunidad C presente en el tejido. La manera en que el PKI y R compiten por la regulación de C no está completamente dilucidada. Una posibilidad es que el PKI sea utilizado para controlar la subunidad C libre hasta que pueda ser secuestrada por R, preferencialmente por RI recién sintetizada. También es posible que el PKI sea utilizado para controlar C libre en circunstancias en que R tiene baja afinidad por C debido a la unión de AMPc. Recientemente se ha demostrado que el PKI endógeno es responsable de la inhibición de la PKA nuclear y que este modo de terminar la señalización vía PKA es, en algunos casos preponderante sobre la exportación de la subunidad C al citoplasma (Chen y col., 2005)

Microdominios de AMPc. Recientemente han surgido evidencias que indican la existencia de «restricciones de difusión de segundos mensajeros» que generan la compartimentalización de los mismos. Se han descrito microdominios de AMPc en retículo endoplásmico de cardiomiocitos y en neuronas (Rich y col., 2000; Scriven y col., 2000). Estos microdominios de AMPc serían modelados o limitados espacialmente por fosfodiesterasas de AMPc (PDEs). Es posible que los gradientes de AMPc generados por distintos ligandos sean organizados específicamente para seguir una ruta particular de señalización vía PKA a través de uno o más complejos PKA-AKAP. En cardiomiocitos se ha descrito una AKAP que ancla PDE4D3 y PKA tipo II a una región perinuclear (Dodge y col., 2001). Como PDE4D3 es activada por fosforilación vía PKA esta colocalización espacial establece una vía de regulación negativa que termina con la señal local de AMPc.

Estos resultados van aclarando la significación funcional de las distintas isoformas de la PKA en eucariotas cuya existencia es aún enigmática.

7. PKA y dimorfismo en *C. albicans*

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se purificó y caracterizó la PKA de *C. albicans* (Zelada y col., 1998). La holoenzima purificada a partir de células levaduriformes posee una estructura tetramérica (de 287 kDa) formada por dos subunidades catalíticas que presentan una masa molecular inusualmente alta (aproximadamente 78 kDa) y de dos subunidades regulatorias de 64 kDa. La holoenzima es completamente dependiente de AMPc. Las Kms calculadas para el ATP y el kemptido son de 30 y 60 mM respectivamente.

La subunidad R es del tipo II, es fosforilada por C en una reacción intramolecular y une 2 moles de AMPc por mol de monómero. Utilizando la subunidad R expresada en *E. coli*, tanto en su forma nativa como mutagenizada en el sitio de autofosforilación, se demostró *in vitro* que la autofosforilación de R disminuye su afinidad por C y la enzima se disocia con menor concentración de AMPc (Zelada y col., 2002).

Posteriormente se encontró que existen dos isoformas de la subunidad catalítica de la PKA que están codificadas por los genes *TPK1* y *TPK2* (Sonneborn y col., 2000; Bockmühl y col., 2001) y en nuestro laboratorio demostramos que ambas isoformas de C se expresan en una cepa salvaje de *C. albicans* (Cloutier y col., 2003). Con respecto a la subunidad R, existe una única isoforma codificada por el gen *BCY1*, nombrado de esta manera por su homología con su par en *S. cerevisiae* (Cassola y col., 2004).

Analizando el rol de la PKA en la transición levadura → micelio en *C. albicans*, encontramos que la eliminación de ambos alelos del gen *TPK2*, además de reducir la actividad total de PKA en las mutantes, resultaba en una capacidad disminuida para diferenciar en medio líquido en presencia de concentraciones subsaturantes del inductor NAcGlc. Más aún, esta germinación era bloqueada por el inhibidor específico de PKA (PKI) y aumentada por la presencia en el medio de inducción de AMPc o de su derivado dbAMPc (dibutiril-AMPc) (Cloutier y col., 2003). Estos resultados, junto con los de Sonneborn y col. y Bockmühl y col. mencionados en el párrafo anterior, son fuerte evidencia bioquímica del rol positivo de Tpk1p y Tpk2p en la transición dimórfica e indican que mayor nivel de PKA correlaciona con una mayor capacidad germinativa. Sin embargo, una cepa que carece de los dos alelos del gen *BCY1*, es decir que carece por completo de subunidad regulatoria y que en consecuencia presenta una actividad PKA constitutiva, independiente de AMPc, presentó un fenotipo agerminativo; además presentó una localización de Tpk1p dispersa en toda la célula, en contraposición a la localización nuclear de esta proteína en la cepa parental (Cassola y col., 2004). Estos resultados tomados en conjunto indican que si bien la actividad PKA es necesaria para el gatillado de la diferenciación inducida por NAcGlc, intervienen eventos regulatorios que permiten modular la actividad de PKA en el tiempo (por ejemplo por disociación de la holoenzima debida a pulsos de AMPc) o en el espacio (por ejemplo, por cambios en la localización subcelular que regulan la disponibilidad de la enzima en los diferentes compartimentos celulares) o en ambos.

El hecho de contar en nuestro laboratorio con una cepa mutante que carece de ambos alelos del gen para la isoforma Tpk1 de la subunidad catalítica (cepa *tpk1*), permitió profundizar el estudio de los roles de ambas isoformas de C. Así se encontró que si bien la actividad fosfotransferasa medida en condiciones estándar en la cepa *tpk1* es equivalente a la de la cepa parental CAI4 (contiene ambas isoformas de C), y en algunos casos la supera, su capacidad germinativa en NAcGlc está muy disminuída, tal que a los 120 min de inducción, cuando las cepas parental y *tpk2* han alcanzado el 100% de germinación, *tpk1* presenta escasamente un 40 % de tubos germinativos y la diferenciación no progresa. Estos resultados indican nuevamente que no es simplemente el nivel de actividad de PKA lo que determina la capacidad germinativa sino que, además de los posibles eventos regulatorios mencionados en el párrafo anterior, las dos enzimas no son totalmente redundantes en el gatillado de la transformación levadura → micelio inducida por NAcGlc.

1. Organismos y condiciones de cultivo

1.1. *Candida albicans*

1.1.1. Cepas

En este trabajo se utilizaron las cepas de *C. albicans* que se muestran en la Tabla 1. Las cepas fueron mantenidas en placas de petri en medio YPD (extracto de levadura 1 %, Bacto peptona 2 %, glucosa 2 %) agarizado suplementado con uridina 50 mg/litro (YPD + Uri), y se repicaron cada 30 días en medio fresco. Stocks de cada cepa se conservaron a -70°C en medio YPD líquido conteniendo 15 % glicerol.

Tabla 1. Cepas de *C. albicans* utilizadas en este trabajo

Cepas	Genotipo	Fuente
CAI4	<i>ura3::?</i> <i>imm 434/ura3::?</i> <i>imm 434</i>	Fonzi e Irwin, 1993
7HH 6-4a*	<i>ura3::?</i> <i>imm 434/ura3::?</i> <i>imm 434</i> <i>tpk1?</i> :: <i>Cat/tpk1?</i> :: <i>Cat</i>	Bockmühl y col., 2001
H2D**	<i>ura3::?</i> <i>imm 434/ura3::?</i> <i>imm 434</i> <i>tpk2?</i> :: <i>Cat/tpk2?</i> :: <i>Cat</i>	Cloutier y col., 2003

* De aquí en más referida como *tpk1*

** De aquí en más referida como *tpk2*

1.1.2. Cultivos

Para la obtención de cultivos levaduriformes de las cepas CAI4, *tpk1* y *tpk2* las células provenientes de cultivos en medio sólido se inocularon en medio líquido YPD adicionado con uridina 50 µg/ml. Los cultivos se crecieron a 28°C con agitación orbital, manteniendo una relación atmósfera : medio de cultivo de 4:1. Estos cultivos se utilizaron como preinóculos para iniciar cultivos líquidos de volúmenes variables de medio YPD + Uri. Para la extracción y purificación de enzimas las células se cultivaron en frascos Fernbach de 1 litro con la misma relación atmósfera : medio de cultivo.

1.2. *Escherichia coli*

1.2.1. Cepas

Para la sobreexpresión de la subunidad regulatoria de *C. albicans* se utilizó la cepa *E. coli* BL21 con el inserto correspondiente y resistencia a kanamicina. Esta cepa fue desarrollada en el laboratorio del Dr. Luc Giasson.

1.2.2. Cultivos

Las células se cultivaron en medio líquido LB (ClNa 1 %, triptona 1 %, extracto de levadura 0.5 %). Para crecer las bacterias en medio sólido se utilizó medio LB agarizado al 2%. Cuando fue necesario se agregaron los siguientes antibióticos: kanamicina (30 mg/ml) o ampicilina (50 mg/ml).

2. Condiciones de formación de tubos germinativos

Las células levaduriformes provenientes de un cultivo en fase estacionaria se cosecharon por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min, se lavaron 2 veces con H₂O destilada y se resuspendieron a una densidad final de 2 x 10⁶ células/ml en el medio descrito por Shepherd y col., (1980) cuya composición es: buffer imidazol 20 mM, pH 6.6; Cl₂Mn 0.2 mM, y NAcGlc 10 mM o suero como inductores de la germinación. El cultivo se incubó en baño de agua a 37°C con agitación orbital y la evolución de formación de tubos germinativos se monitoreó por microscopía de campo claro. La estimación del número de células que poseían tubo germinativo o brote al menos tan grande como la mitad de la blastopora se llevó a cabo utilizando cámara hemocitométrica. Cuando fue necesario se agregó SDS 1% al preparado para favorecer la desagregación de las células.

3. Condiciones de formación de pseudohifas

Para inducir el desarrollo de pseudohifas, las células cosechadas y tratadas como se indica en el ítem anterior se resuspendieron a una densidad final de 2 x 10⁵ células/ml en medio YPD, adicionado con uridina. El cultivo se incubó a 35°C con agitación orbital y la evolución de la formación de pseudohifas se monitoreó de la misma forma que para la formación de hifas.

4. Preparación de extractos celulares

Todas las operaciones fueron llevadas a cabo a 4°C. Las células fueron cosechadas por centrifugación, lavadas dos veces con agua destilada y resuspendidas en el buffer de homogeneización correspondiente.

Extractos solubles para purificación de las enzimas. Las células cosechadas fueron resuspendidas en buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6,8; EGTA 1 mM; EDTA 1 mM; β -mercaptoetanol 10 mM (buffer A) adicionado con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Los extractos crudos se obtuvieron por ruptura de las células en French pressure cell a 70 Mpa (1.000psi), seguido de centrifugación a 3.000 rpm por 15 min. Finalmente el extracto se clarificó a 36.000 rpm (100.000g) durante 1 hora y al sobrenadante obtenido de lo denominó fracción S100. Este método de preparación de extractos permite procesar una cantidad importante de células, obteniéndose una buena extracción de proteínas, por lo cual fue usado fundamentalmente para las etapas de purificación de enzimas.

Extractos crudos para técnicas inmunológicas. Las células provenientes de los diferentes cultivos en medio líquido se cosecharon y lavaron dos veces en frío con H₂O destilada, y se resuspendieron en 2 volúmenes de buffer A adicionado con inhibidores de proteasas. Las células se rompieron por agitación durante un minuto en vortex en presencia de 2 volúmenes de perlas de vidrio; el tratamiento se repitió siete veces con intervalos de 1 min a 0°C entre cada tratamiento. La temperatura se mantuvo entre 0 y 4°C. El extracto obtenido se centrifugó en frío a 10.000 rpm durante 30 minutos para separar restos celulares, las perlas de vidrio y células no rotas. El sobrenadante (S10) se utilizó inmediatamente en los ensayos.

Inhibidores. Los inhibidores de proteasas utilizados fueron: antipaina 20 μ g/ml; leupeptina 20 μ g/ml; pepstatin-A 20 μ g/ml; PMSF 1 mM. Como inhibidores de fosfatasa se utilizaron: fluoruro de sodio 50 mM y glicerofosfato de sodio 150 mM.

5. Determinación de proteínas

La cantidad de proteína en las preparaciones se midió por el método de Bradford (1976) utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

6. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS

Las electroforesis en geles de poliacrilamida 10% se realizaron siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970) utilizando minigeles y geles medianos. Las muestras se resuspendieron en solución de Laemmli (Tris-ClH 0.25 M, pH 6,8; β -mercaptoetanol 3 M; glicerol 20% v/v; SDS 0.3 M y azul de bromofenol 0,05% p/v) y calentadas durante 2 min en agua a 100°C. Las corridas se llevaron a cabo a corriente constante de 35-40 mA y temperatura ambiente. Las proteínas se visualizaron por tinción de los geles con el colorante Coomassie Brilliant Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% p/v; metanol 20% v/v; ácido acético 40% v/v); los cuales luego se destiñeron en solución decolorante (metanol 45%, ácido acético 10%) y finalmente se secaron al vacío con calor. La detección de proteínas marcadas con ³²P se llevó a cabo exponiendo los geles secos a placas radiográficas AGFA Curix RP-1.

7. Técnicas inmunológicas

7.1. Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF por transferencia semi seca durante 90 minutos a 2.5 mA/cm² en una solución de Tris base 50 mM; glicina 40 mM; SDS 0.04 % y metanol 20 %. Las proteínas transferidas se visualizaron por tinción reversible con solución Ponceau S 0.1% en ácido acético 5%. Posteriormente la membrana se bloqueó por incubación con TBST-leche (buffer Tris-HCl 10 mM pH 6.8; ClNa 0.9 %; Tween-20 0.05 % y leche en polvo descremada 5%) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación la membrana se incubó con una dilución 1/6.000 del antisuero anti-subunidad R de *C. albicans*, o con una dilución 1/200 del anticuerpo monoclonal de ratón anti-HIS (His probe H3. SC 8036 - Santa Cruz Biotechnology) durante toda la noche a 4°C en agitación. Finalizada la incubación las membranas se lavaron e incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia del segundo anticuerpo (anti IgG de conejo o ratón conjugado a fosfatasa alcalina) y los inmunocomplejos se revelaron utilizando BCIP (5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato) y NBT (Nitro Blue Tetrazolium) en buffer de revelado TNM

(Tris-ClH 100 mM, pH 9.5; ClNa 100 mM; Cl₂Mg 100 mM). La reacción se detuvo por inmersión de la membrana en H₂O destilada.

8. Ensayos Enzimáticos

8.1. Medición de la actividad de PKA

La actividad de PKA se midió de acuerdo a Zelada y col. (1998). El ensayo estándar se llevó a cabo en un volumen final de 60 ml conteniendo: Tris-ClH 20mM, pH 7.5; Cl₂Mg 10mM; b-mercaptoetanol 1 mM; [γ-³²P]ATP 0.1 mM (0.1-0.5 Ci/mmol) y kémtido 0.1 mM como sustrato exógeno aceptor del grupo fosfato, en presencia y ausencia de AMPc 10 mM. Después de incubar a 30°C por 10 minutos, la reacción se detuvo sembrando la mezcla de reacción en papeles de fosfoceulosa, los cuales se lavaron con PO₄H₃ 75 mM según Roskoski (1983); la radioactividad retenida en los mismos se determinó en contador de centelleo líquido.

8.2. Activación por AMPc

Alícuotas de la holoenzima parcialmente purificada fueron incubadas en las mismas condiciones descritas para la determinación de la actividad enzimática pero en presencia de concentraciones crecientes de AMPc en el rango 10-400 μM.

8.3. Desfosforilación de extractos crudos

Los ensayos de desfosforilación en extractos crudos (preparados como se indica en la sección 4) se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 40 ml. Volúmenes apropiados conteniendo 100 mg de proteínas totales se incubaron con la mezcla de reacción conteniendo: Cl₂Mn 2 mM; buffer de reacción (Tris-ClH 50 mM; ditiotreitól 5 mM; EDTA 0.1 mM; Brij 35 0.01%; pH final 7,5); 1il ñ fosfatasa (400 U) y H₂O csp 40il. La reacción se incubó durante 30 min a 30°C y se analizaron los resultados por Western blot (secciones 6 y 7.1).

8.4. Determinación de la afinidad por el kémtido

Alícuotas de la holoenzima parcialmente purificada fueron tratadas como en el ensayo estándar de medición de actividad de PKA (ítem 8.1), variando únicamente la concentración del kémtido, el cual fue agregado en concentraciones crecientes en el rango 10 μM - 800 μM.

9. Purificación parcial de la PKA de *C. albicans*

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C y todos los buffer utilizados contienen inhibidores de proteasas. La fracción S100 se sembró en una columna de intercambio aniónico DE-52 (5 ml) previamente equilibrada con buffer A. La columna se lavó con 5 volúmenes del mismo buffer y la proteína retenida se eluyó con 4 volúmenes de: buffer A 100 mM ClNa, buffer A 200 mM ClNa y buffer A 400 mM ClNa. Se recogieron fracciones de 0.5 ml. Se midió actividad de PKA en alícuotas apropiadas de cada fracción como se describió en 8.1 .

10. Expresión y purificación de la subunidad regulatoria de la PKA

10.1. Expresión de la subunidad regulatoria recombinante

10.1.1. Sistema de expresión

Se utilizó el plásmido de expresión en bacterias pET 28a. Este plásmido confiere resistencia a kanamicina y contiene una secuencia adyacente al sitio de clonado que codifica para un péptido de histidina (6-8 residuos). En este plásmido está clonado el gen salvaje de la subunidad regulatoria R de la PKA y se usó para transformar la cepa de *E.coli* BL21 (DE3), especialmente diseñada para inducir por IPTG la expresión de los genes clonados en plásmidos pET (Studier y Moffat, 1986)

10.1.2. Expresión

La expresión de la proteína se llevó a cabo esencialmente como se describió en un trabajo previo de nuestro laboratorio (Zelada y col., 2002). Células de *E. coli* BL21 provenientes de una sola colonia crecidas en medio sólido LB se inocularon en 2 ml de medio líquido LB conteniendo kanamicina 30 ñg/ml, el cual se incubó a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.6 – 1. Las células se colectaron por centrifuga-

ción y se resuspendieron en 100 ml de medio fresco (LB-kanamicina). Se incubó el cultivo a 37°C con agitación orbital, hasta alcanzar una DO_{600} de 0.6. Se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubó por tres horas.

10.2. Purificación de la subunidad R recombinante

10.2.1. Preparación del extracto

Se partió de células provenientes de 100 ml de un cultivo de 3 h de inducción. Las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min y se resuspendieron en buffer de siembra: imidazol 5 mM, ClNa 500 mM, Tris-ClH 20 mM, pH final 7,9. Las células se sometieron a sonicación durante 30 seg en potencia 6 seguidos de otros 30 seg en reposo. Esta operación se repitió cuatro veces manteniendo el recipiente en baño de hielo y sal. El lisado obtenido se centrifugó a 100.000g a 4°C durante 1 h. El pellet (P100) se guardó y el sobrenadante (S100) se sembró en una columna de Ni^{2+} preparada como se indica a continuación

10.2.2. Preparación de la resina y desarrollo de la columna

Se armó una columna de 2 ml con la resina de quelación de metales His-Bind producida por Novagen. El Ni^{2+} fue unido a la resina por pasaje de 5 volúmenes de $NiSO_4$ 50 mM y posteriormente se equilibró por el pasaje de 3 volúmenes del buffer de siembra. El S100 antes obtenido se sembró en la columna, se recogió el percolado y se sembró nuevamente. Esta operación se repitió dos veces. La columna se lavó por el agregado de 10 volúmenes de buffer de siembra, seguido del agregado de 6 volúmenes de buffer de lavado: imidazol 60 mM, ClNa 500 mM, Tris-ClH 20 mM; pH final 7,9. La proteína se eluyó por el pasaje de 6 volúmenes de buffer de elución: imidazol 1 M, ClNa 500 mM, Tris-ClH 20 mM, pH final 7,9. El eluido se recogió en fracciones de 500 ml.

10.3. Liberación del AMPc unido

Para liberar a las proteínas expresadas del AMPc unido a las mismas, se siguió el método descrito por Etchebere y col. (1997) que básicamente consiste en dializar el eluido de la columna durante 24 h a 4°C contra 200 ml de urea 8 M, con 3 cambios de igual volumen de la misma solución. El AMPc residual se eliminó por pasaje a través de una columna de filtración (Sephadex-G25) de 5 ml equilibrada con urea 8 M.

La proteína libre de AMPc, se renaturalizó por diálisis durante 24 h a 4°C contra 250 ml del siguiente buffer: Tris-ClH 10 mM, pH 7,5; ClK 150 mM y β -mercaptoetanol 0.5 mM; se realizaron 4 cambios de buffer. Posteriormente la solución dializada se centrifugó a 20.000 rpm durante 15 min a 4°C para eliminar la proteína desnaturalizada.

La poli-histidina terminal no se removió, ya que no interfiere en los ensayos de fosforilación y al mismo tiempo permite la identificación de la proteína expresada utilizando el anticuerpo monoclonal anti-His por la técnica de Western blot (ver secciones 6 y 7.1)

11. Fosforilación y desfosforilación de la subunidad R recombinante

Los ensayos de fosforilación de la subunidad R recombinante por C de corazón bovino se llevaron a cabo en un volumen final de 60 ml de una mezcla de reacción conteniendo: TrisClH 20 mM, pH 7.5; Cl_2Mg 10 mM; β -mercaptoetanol 1 mM; $[g\text{-}^{32}P]ATP$ 0.1 mM (0.1-0.5 Ci/mmol); 0.526 mg de subunidad R expresada (sustrato) y 2 U de subunidad C bovina (preparada a partir de sólido liofilizado disuelto en ditiotreitol 0.05M) en presencia y ausencia de AMPc 10mM. Después de incubar a 30°C por 10 minutos, la reacción se detuvo y se cuantificó como se describió en 8.1.

La desfosforilación de la subunidad R fosforilada se llevó a cabo en presencia de l fosfatasa como se describió en 8.3 y los resultados se analizaron por Western blot (secciones 6 y 7.1) La detección de proteínas marcadas con ^{32}P se llevó a cabo por autorradiografía de los geles secos y de las membranas utilizando placas radiográficas AGFA Curix RP-1.

12. Microscopía

Las células se visualizaron por microscopía de campo claro con aumento final de 400x. Para diferenciar con mayor claridad las hifas y pseudohifas, se colorearon las células con calcoflúor 1 mg/ml y se observaron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX50 con aumento final de 1000x. Las imágenes se tomaron con una cámara digital color CoolSNAP-Pro_{cr} usando el software Image Pro Plus (Media Cybernetics)

13. Materiales

Inhibidores de proteasas, kémpitido, AMPc, ATP, Calcofluor, anticuerpos anti-IgG de conejo y de ratón acoplados a fosfatasa alcalina fueron provistos por Sigma Chemical Co. Yeast Nitrogen Base y Bacto Peptona se adquirieron en Difco. Se utilizó papel de fosfofocelulosa p-81 de Whatman. Las membranas de PVDF (Immobilon-P) fueron provistas por Millipore Corp. [g-³²P]ATP fue adquirido a New England Nuclear y Lambda fosfatasa a BioLabs New England. Los reactivos utilizados para electroforesis en geles de poliacrilamida son de grado electroforético y provistos por BioRad. Todos los otros reactivos utilizados son de grado analítico.

Discusión

La relación entre morfología y virulencia en varias especies de hongos patógenos dimórficos ha llevado a que muchos laboratorios dirijan sus investigaciones al estudio de los mecanismos bioquímicos que regulan la morfogénesis en este tipo de hongos. En el caso de *C. albicans* la forma miceliana parece estar relacionada positivamente con el grado de virulencia aunque no es el único parámetro determinante de la aparición de la enfermedad (candidiasis).

En nuestro laboratorio y en otros se estudia desde hace años la relación entre la vía de transducción de señales AMPc/PKA y la transición dimórfica levadura → micelio y ha quedado demostrado que las dos isoformas de PKA presentes en el hongo tienen un rol positivo en el proceso morfogenético (Sonneborn y col., 2000; Bockmühl y col. 2001; Cloutier y col., 2003). Estos estudios se han llevado a cabo con mutantes deficientes en alguno de los genes involucrados, con lo cual, si bien se puede concluir sobre el requerimiento de los mismos, el rol de las proteínas a nivel bioquímico no se conoce. En nuestro caso, utilizando las cepas mutantes que carecen de una u otra de las dos isoformas de la subunidad C de PKA, encontramos que, contrariamente a lo esperado, la cepa con menor actividad enzimática (cepa *tpk2*) presenta un comportamiento germinativo semejante al de la cepa parental y que en cambio la cepa *tpk1*, con mayor actividad enzimática presenta una germinación tardía y deficiente. Este comportamiento nos llevo a concluir que, al menos en medio líquido en presencia de NAcGlc, la transducción de la señal que lleva a la célula a morfogénizar está primordialmente mediada por Tpk1p pese a que la actividad medida en condiciones estandar, cuando es la única PKA presente en la célula, es menor que en las otras dos cepas.

Con el presente trabajo se inicia un estudio dedicado a profundizar en las características bioquímicas de las isoformas de la subunidad catalítica de PKA, proteínas Tpk1 y Tpk2, que permita avanzar en el conocimiento de los roles que la presencia de una u otra, integrando las holoenzimas correspondientes, tienen en el gatillado y desarrollo de la forma miceliana.

Respecto de los fenotipos filamentosos que presenta *C. albicans* encontramos que además de afectar en forma diferencial la formación de hifas como se había descrito, la presencia de una u otra de las isoformas de C generan un comportamiento distinto en la formación de pseudohifas. En contraposición a lo que ocurre en la formación de hifas, la isoforma Tpk2p parece ser necesaria para el crecimiento filamentosos (exclusivamente pseudohifas) en medio rico a 35° C. Es sabido que el desarrollo de hifas y de pseudohifas en *C. albicans* responde a distintos programas de diferenciación tanto a nivel génico como molecular (Sudbery P, 2001). Es interesante resaltar además que en *S. cerevisiae*, organismo que ha sido tomado como sistema modelo para el estudio de la diferenciación de *C. albicans* y otros hongos, la única forma filamentososa que desarrollan las células haploides es la de pseudohifa y de las tres isoformas de la subunidad C (Tpk1-3), la única con un rol positivo en la diferenciación es Tpk2p, justamente el homólogo de Tpk2p de *C. albicans*. Nos parece entonces relevante considerar la transición levadura → pseudohifa en *C. albicans* como un nuevo modelo que podría ser utilizado para profundizar los estudios a los que estamos abocados.

El comportamiento cromatográfico en columna de intercambio aniónico de las enzimas provenientes de las tres cepas es idéntico y semejante al anteriormente descrito para PKA de una cepa salvaje (Zelada y col., 1998); en todos los casos prácticamente toda la actividad dependiente de AMPc eluyó como un único pico con 100 mM ClNa. El estudio de las propiedades bioquímicas de las isoenzimas indica que, hasta donde se puede concluir utilizando enzimas parcialmente purificadas, el comportamiento de ambas frente a concentraciones crecientes de AMPc es el típico descrito para las PKAs de distintas fuentes en las cuales la ocupación cooperativa de los dos sitios para el nucleótido cíclico en la subunidad regulatoria facilita la liberación de la subunidad catalítica activa.

El análisis de los parámetros cinéticos Km y Vm arrojó en cambio datos que diferencian netamente a la enzima integrada por Tpk1p (Tabla 2). Las mediciones llevadas a cabo con la enzima de las cepas CA14 (presencia simultánea de Tpk1p y Tpk2p) y *tpk1* (solo Tpk2p) resultaron en valores de Km para el kémpitido,

y de Vm dentro del rango informado por otros autores para PKAs de eucariotas inferiores. En cambio para Tpk1p la Km resultó ser un orden de magnitud mayor y la Vm el 50% de la de Tpk2p. Estos resultados, si bien en parte explican las diferencias encontradas en los extractos crudos, también indican que con el ensayo que se utiliza de rutina resulta muy dudoso sacar conclusiones sobre la actividad de Tpk1p, ya que las condiciones no son las óptimas para la medición de esta enzima. Respecto del alto valor de Km se podría plantear, a nivel especulativo por el momento, que Tpk1p tiene requerimientos adicionales para el reconocimiento de su(s) sustrato(s), más allá de la presencia en el mismo de la secuencia canónica para ser fosforilada, y que no están presentes en el kemptido. De hecho, se ha demostrado que péptidos artificiales de 9 amino ácidos que poseen un residuo arginina en la posición – 6 respecto de la serina fosforilable disminuyen la Km de la PKA bovina en treinta veces comparada con la Km medida utilizando kemptido, resultado congruente con un aumento de afinidad de la enzima por sustratos de mayor tamaño (Moore y col., 2003); podría ocurrir algo similar en este caso con los sustratos fisiológicos y ser muy distinto el comportamiento de la enzima in vivo. Modificaciones post-traduccionales de la proteína, como fosforilación, podrían también regular su actividad en momentos claves de la inducción de la diferenciación; existen antecedentes en la bibliografía en este sentido ya que la subunidad catalítica de la PKA bovina es una fosfoproteína cuyo estado de fosforilación se relaciona con un aumento de actividad y la isoforma Tpk1p de *S. cerevisiae* presenta un aumento de casi 2 veces en su eficiencia catalítica sobre kemptido cuando está fosforilada (Humphries y col., 2004; Portela, P. Tesis Doctoral, 2005, respectivamente). Por el momento carecemos de anticuerpos para reconocer las subunidades catalíticas por lo que no podemos evaluar las cantidades de cada una de las isoformas presentes en las respectivas cepas. Teniendo en cuenta que alguna de las dos Tpk debe estar presente para asegurar la viabilidad de las células y que la velocidad de crecimiento de las tres cepas en estudio es la misma (resultado no mostrado), no parece esperable una diferencia muy marcada en las cantidades de Tpk1p y Tpk2p en las respectivas mutantes. Sabemos además que, si bien este dato no se puede relacionar directamente con la cantidad de proteína realmente expresada, los niveles de mensajeros de las dos proteínas no difieren mayormente en células en el estado estacionario (Souto y col, manuscrito en preparación).

De las modificaciones post-traduccionales de proteínas, la fosforilación es la más extensamente involucrada en los mecanismos bioquímicos de transducción de señales. En lo que respecta a la subunidad reguladora de la PKA, como se mencionó en la Introducción, la subunidad de tipo II presenta un sitio fosforilable por la misma subunidad C y varios sitios consenso para otras quinasas de proteínas y de hecho se la ha encontrado como fosfoproteína *in vivo* en varios sistemas, entre ellos en *C. albicans* (Zelada y col., 2002). En hongos se ha demostrado que algunas de las fosforilaciones de R tienen consecuencias en las propiedades de la enzima que podrían tener un rol crucial en su función reguladora in vivo como ser: en *C. albicans*, disminución de la afinidad por C cuando es fosforilada en el dominio «sustrato» de interacción con C y, en *S. cerevisiae*, señalar la traslocación desde el núcleo al citoplasma cuando es fosforilada en la región amino terminal por una quinasa específica (Zelada y col., 2002 y Griffioen y col, 2001, respectivamente). Los resultados mostrados en este trabajo son indicativos de la posible existencia de formas fosforiladas de R en células estacionarias de las cepas CA14 y *tpk1* que está ausente en *tpk2*. Estos resultados, si bien preliminares, nos están señalando otra diferencia entre las PKAs que podría tener implicancia en sus roles in vivo y serán confirmados y ampliados con experimentos realizados de marcación metabólica in vivo con ATP³²P y electroforesis en dos dimensiones.

Conclusiones

Hemos demostrado que:

- El camino de transducción AMPc/PKA tiene algún rol en la transformación levadura pseudohifa que podría ser un nuevo modelo a utilizar en busca de mayores datos sobre los roles de las isoformas de PKA en los mecanismos bioquímicos que gobiernan la diferenciación en *C. albicans*.
- Existen importantes diferencias en las propiedades catalíticas de las isoformas de C que nos indican la necesidad de profundizar su análisis especialmente dirigido al estudio de sustratos fisiológicos de PKA.
- La subunidad R se encuentra fosforilada en forma diferencial en las holoenzimas derivadas de Tpk1p y Tpk2p. Dada la importancia asignada a R, especialmente en la localización de PKA, esta diferencia puede ser, entre otras cosas, indicativa de destinos subcelulares diferentes para Tpk1p y Tpk2p.

Bibliografía

- Anjard C, Etchebehere L, Pinaud S, Veron M, Reymond CD. (1993). An unusual catalytic subunit for the cAMP-dependent protein kinase of *Dictyostelium discoideum*. *Biochemistry*. 32: 9532-8.
- Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM. (1994). Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem. Sci.* 19: 279-83. Review.
- Beavo JA, Bechtel PJ, Krebs EG (1974). Preparation of homogeneous cyclic AMP-dependent protein kinase(s) and its subunits from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol*. 38: 299-308.
- Beebe SJ, Corbin JD. (1986). Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *The Enzymes*. 17: 43-111
- Beebe SJ, Øyen O, Sandberg M, Frøysa A, Hansson V, Jahnsen T. (1990). Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C α) from human testis - representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol* 4: 465-75
- Bockmühl, D.P., Krishnamurthy, S., Gerards, M., Sonneborn, A., and Ernst, J.F. (2001). Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1p and Tpk2p in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 42: 1243-1257.
- Borrelli E, Montmayeur JP, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. (1992). Signal transduction and gene control: the cAMP pathway. *Crit. Rev. Oncog.* 3: 321-38.
- Bossemeyer D, Engh RA, Kinzel V, Ponstingl H, 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 Å structure of the complex with Mn²⁺ adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24). *EMBO J.* 12: 849-59.
- 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: 248-354.
- Bramley TA, Menzies GS, Williams RJ, Adams DJ, Kinsman OS (1990) Specific, high-affinity binding sites for human luteinizing hormone (hLH) and human chorionic gonadotrophin (hCG) in *Candida* species. *Biochem Biophys Res Commun.* 167: 1050-6.
- Buechler JA, Taylor SS. (1990). Differential labeling 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: 1937-43.
- Buechler YJ, Herberg FW, Taylor SS. (1993). Regulation-defective mutants of type I cAMP-dependent protein kinase. Consequences of replacing arginine 94 and arginine 95. *J Biol Chem.* 268: 16495-503.
- Carr DW, Stofko-Hahn RE, Fraser ID, Bishop SM, Acott TS, Brennan RG, Scott JD. (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
- Cassola A, Parrot M, Silberstein S, Magee BB, Passeron S, Giasson L, Cantore ML. (2004). *Candida albicans* lacking the gene encoding the regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase displays a defect in hyphal formation and an altered localization of the catalytic subunit. *Eukaryotic Cell.* 3: 190-199
- Castilla R, Passeron S, Cantore ML. (1988). N-Acetyl-D-glucosamine induces germination in *Candida albicans* through a mechanism sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase. *Cell. Signal.* 10:713-719
- Caticha O, Grover S, Winge D, Odell WD. (1992). Stimulation of *Candida albicans* transition by human chorionic gonadotrophin and a bacterial protein. *Endocr Res.* 18:133-43.
- Clark KL, Feldmann PJ, Dignard D, Larocque R, Brown AJ, Lee MG, Thomas DY, Whiteway M. (1995). Constitutive activation of the *Saccharomyces cerevisiae* mating response pathway by a MAP kinase kinase from *Candida albicans*. *Mol. Gen. Genet.* 249: 609-21
- Clegg CH, Cadd GG, McKnight GS. (1988). Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 3703-3707
- Cloutier M, Castilla R, Bolduc N, Zelada A, Martineau P, Bouillon M, Magee BB, Passeron S, Giasson L, Cantore ML. (2003). The two isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit are involved in the control of dimorphism in the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genet. Biol.* 3: 133-141
- Colledge M, Scott JD. (1999) AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol.* 9: 216-21
- Chen X, Dai JCh, Orellana SA, Greenfield EM. (2005) Endogenous protein kinase inhibitor g terminates immediate-early gene expression induced by cAMP-dependent protein kinase (PKA) signaling. *J. Biol. Chem.* 280: 2700-07
- Dodge KL, Khouangsathiene S, Kapiloff MS, Mouton R, Hill EV, Houslay MD, Langeberg LK, Scott JD (2001). mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J* 20: 1921-30.

- Doskeland SO, OGREID D. (1984). Characterization of the interchain and intrachain interactions between the binding sites of the free regulatory moiety of protein kinase I. *J Biol Chem.* 259: 2291-301.
- Egidy, G., Paveto, M. C., Passeron, S. & Galvagno, M. A. (1989). Relationship between cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and germination in *Candida albicans*. *Exp. Mycol.*, 13: 428-432.
- Egidy, G., Paveto, C., Passeron, S., & Galvagno, M. A. (1990). cAMP levels and in situ measurements of cAMP related enzymes during yeast-to-hyphae transition in *Candida albicans*. *Cell. Biol. Int. Rep.* 14: 59-68.
- Ernst JF. (2000). Transcription factors in *Candida albicans* - environmental control of morphogenesis. *Microbiology.* 146: 1763-74. Review.
- Etchebehere, L. C., Van Bemmelen, M. X. P., Anjard, C., Traincard, F., Assemat, K., Reymond, C. & Véron, M. (1997). The catalytic subunit of *Dictyostelium* cAMP-dependent protein kinase role of the N-terminal domain and of the C-terminal residues in catalytic activity and stability. *Eur. J. Biochem.* 248: 820-826.
- Evans EG, Odds FC, Richardson MD, Holland KT. (1975). Optimum conditions for initiation of filamentation in *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.* 21: 338-42
- Fantozzi DA, Taylor SS, Howard PW, Maurer RA, Feramisco JR, Meinkoth JL. (1992). Effect of the thermostable protein kinase inhibitor on intracellular localization of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 267: 16824-8
- Feng Q, Summers E, Guo B, Fink G. (1999). Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. *J Bacteriol.* 181: 6339-46.
- Fimia GM**, Sassone-Corsi P. (2001). **Cyclic AMP signalling.** *J. Cell Sci.* 114: 1971-1972
- Fischer EH, Krebs EG. (1955). Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem* 216: 121-132
- Fonzi WA, Irwin MY. (1993). Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics.* 134: 717-28
- Gilman. AG.(1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-49
- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR. (1992). Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell.* 68: 1077-90
- Granot, J., Midvan, A.S., Hiyama, K., Kondo, H. & Kaiser, E.T. (1980). Magnetic resonance studies of the effect of the regulatory subunit on metal and substrate binding to the catalytic subunit of bovine heart protein kinase. *J. Biol. Chem.* 255: 4569-73.
- Gross RE, Bagchi S, Lu X, Rubin CS. (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: 6896-907.
- Griffioen G, Branduardi P, Ballarini A, Anghileri P, Norbeck J, Baroni MD, Ruis H. (2001). Nucleocytoplasmic distribution of budding yeast protein kinase A regulatory subunit Bcy1 requires Zds1 and is regulated by Yak1-dependent phosphorylation of its targeting domain. *Mol. Cell. Biol.* 21(2):511-23
- Griffioen G, Thevelein JM. (2002). Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. *Curr. Genet.* 41: 199-207
- Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R, Montminy MR. (1993). Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* 13:4852-9
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. (1988). The protein kinase family: Conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52
- Hashimoto E, Takio K, Krebs EG. (1981). Studies on the site in the regulatory subunit of type I cAMP-dependent protein kinase phosphorylated by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 256: 5604-7.
- Hausken ZE, Dell'Acqua ML, Coghlan VM, Scott JD.(1996). Mutational analysis of the A-kinase anchoring protein (AKAP)-binding site on RII. Classification of side chain determinants for anchoring and isoform selective association with AKAPs. *J. Biol. Chem.* 271: 29016-29022
- Hedin L, McKnight GS, Lifka J, Durica JM, Richards JS. (1987). Tissue distribution and hormonal regulation of messenger ribonucleic acid for regulatory and catalytic subunits of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases during ovarian follicular development and luteinization in the rat. *Endocrinology.* 120: 1928-35.
- Hemmings B. A., Aitken, A., Cohen, P., Rymond, M., & Hofmann, F. (1982). Phosphorylation of the type-II Regulatory subunit of Cyclic-AMP-dependent protein kinase by Glycogen Synthase kinase 3 and Glycogen Synthase Kinase 5. *Eur. J. Biochem.* 127: 473-481.

- Huang LJ, Durick K, Weiner JA, Chun J, Taylor SS. (1997). Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and II regulatory subunits. *J Biol Chem.* 272: 8057-8064
- Humphries KM, Deal MS, Taylor SS. (2005). Enhanced dephosphorylation of cAMP protein kinase by oxidation and thiol modification. *J Biol Chem* 280:2 750-8
- Jahnsen T, Hedin L, Kidd VJ, Beattie WG, Lohmann SM, Walter U, Durica J, Schulz TZ, Schiltz E, Browner M, Lawrence CB, Goldman D, Ratoosh SL, Richards JS. (1986). Molecular cloning, cDNA structure and regulation of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 261: 12352-12361.
- Jung, WH y Stateva, L. (2003). The cAMP phosphodiesterase encoded by *CaPDE2* is required for hyphal development in *Candida albicans*. *Microbiology* 149: 2961-2976.
- Kalo-Klein, A. y Witkins, S. 1990. Prostaglandin E2 enhances and gamma interferon inhibits germ tube formation in *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 58: 260-262.
- Kemp BE, Graves DJ, Benjamini E, Krebs EG. (1977) Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 252: 4888-94
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Land GA, McDonald WC, Stjernholm RL, Friedman TL. (1975). Factors affecting filamentation in *Candida albicans*: relationship of the uptake and distribution of proline to morphogenesis. *Infect Immun.* 11: 1014-23
- Leberer E, H Marcus D, Broadbent ID, Clark KL, Dignard D, Ziegelbauer K, Schmidt A, Gow NAR, Brown AJP, Thomas DY. (1996). Signal transduction through homologs of the Ste20p and Ste7p protein kinases can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 13217-13222.
- Leberer E, H Marcus D, Dignard D, Johnson L, Ushinsky S, Thomas DY, Schroppel K. (2001). Ras links cellular morphogenesis to virulence by regulation of the MAP kinase and cAMP signalling pathways in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 42: 673-87
- Lee DC, Carmichael DF, Krebs EG, McKnight GS. (1983). Isolation of a cDNA clone for the type I regulatory subunit of bovine cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 80: 3608-3612 .
- Levin LR, Kuret J, Johnson KE, Powers S, Cameron S, Michaeli T, Wigler M, Zoller MJ. (1988). A mutation in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase that disrupts regulation. *Science.* 240: 68-70.
- Levin L. & Zoller MJ. (1990). Association of catalytic and regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase requires a negatively charged side group at a conserved threonine. *Mol. Cell Biol.* 10: 1066-1075
- Loose DS, Schurman DJ, Feldman D. (1981). A corticosteroid binding protein and endogenous ligand in *C. albicans* indicating a possible steroid-receptor system. *Nature.* 8: 293: 477-9.
- Mobashery S, Kaiser ET. (1988). Identification of amino acid residues involved in substrate recognition by the catalytic subunit of bovine cyclic AMP dependent protein kinase: peptide-based affinity labels. *Biochemistry.* 27:3691-6.
- Moore MJ, Adams JA, Taylor SS (2003). Structural basis for peptide binding in protein kinase A. Role of glutamic acid 203 and tyrosine 204 in the peptide-positioning loop. *J.Biol.Chem.* 278: 10613-8.
- Mösch, H.U., Roberts, R. & Fink, G. R. (1996). Ras2 signals via the Cdc4/Ste20/mitogen-activated-kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5352-5356.
- Mutzel R, Lacombe ML, Simon MN, de Gunzburg J, Veron M. (1987). Cloning and cDNA sequence of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 6-10. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 1531.
- Nigg EA. (1990). Mechanisms of signal transduction to the cell nucleus. *Adv Cancer Res.* 55: 271-310. Review.
- Odds, F. C. (1988). *Candida and candidosis*, 2nd ed. Bailliere Tindall, London.
- Odds FC. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol.* 31: S2-5. Review.
- Paveto, M. C., Egidy, G., Galvagno, M. A. & Passeron, S. (1990). A guanine nucleotide-sensitive, glucagon-stimulated adenyl cyclase in *Candida albicans*: Effect of glucagon on cell morphology, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 167: 1177-1183.
- Paveto, M. C., Mallo, G., Egidy, G., Galvagno, M. A. & Passeron, S. (1991). Activation of the cyclic AMP cascade by steroidogenic hormones and glucagon in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Cell Biol. Int. Rep.* 15: 169-178.
- Paveto, C.; Montero, L y Passeron, S. (1992). Enzymatic and immunological detection of G protein alpha-subunits in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *FEBS* 311: 51-54
- Pollack JH, Hashimoto T. (1987). The role of glucose in the pH regulation of germ-tube formation in *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 415-24

- Portela P. (2005). Estudio in vivo del mecanismo de activación de la proteína quinasa dependiente de cAMP. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Ramon A, Porta A, Fonzi WA. (1999). Effects of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. *J. Bacteriol.* 181: 7524-7530.
- Rangel-Aldao, R., & Rosen, O. M. (1977). Effect of cAMP and ATP on the reassociation of phosphorylated and nonphosphorylated subunits of the cAMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. *J. Biol. Chem.* 252: 7140-7145.
- Rich TC, Fagan KA, Nakata H, Schaack J, Cooper DM, Karpen JW (2000) Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *J. Gen. Physiol.* 116: 147-61.
- Roskoski, R (1983). Assay of protein kinase. In: *Methods in Enzymology* Corbin, J. D., & Hardman, J. G., (ed.), 99, pp. 3-6, Academic Press, San Diego.
- Rubin CS, Erlichman J, Rosen OM (1974). Cyclic AMP-dependent protein kinase from bovine heart muscle. *Methods Enzymol.* 38: 308-15.
- Sanchez-Martinez C, Perez-Martin J. (2002). Gpa2, a G-Protein alpha Subunit Required for Hyphal Development in *Candida albicans*. 2002. *Eukaryot. Cell.* 1: 865-74
- Santos MA, Perreau VM, Tuite MF. (1996). Transfer RNA structural change is a key element in the reassignment of the CUG codon in *Candida albicans*. *EMBO J.* 15: 5060-8
- Scott JD, Fischer EH, Demaille JG, Krebs EG. (1985). Identification of an inhibitory region of the heat-stable protein inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82: 4379-83. (a)
- Scott JD, Glaccum MB, Zoller MJ, Uhler MD, Helfman DM, McKnight GS, Krebs EG (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: 5192-6.
- Scott JD, Stofko RE, McDonald JR, Comer JD, Vitalis EA, Mangili JA. (1990). Type II regulatory subunit dimerization determines the subcellular localization of the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 265: 21561-6
- Scriven DR, Dan P, Moore ED. (2000). Distribution of protein implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* 79: 2682-91
- Shabb JB, Corbin JD. (1992). Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions. *J Biol Chem.* 267: 5723-6. Review.
- Shepherd MG, Yin CY, Ram SP, Sullivan PA. (1980). Germ tube induction in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 35: 386-396.
- Shoji S, Ericsson LH, Walsh KA, Fischer EH, Titani K (1983). Amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine type II adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry.* 22: 3702-9.
- Silberstein S, Cantore ML, Galvagno MA, Passeron S. (1990). Isolation and characterization of a dimeric cAMP-dependent protein kinase from the fungus *Saccobolus platensis*. *Arch Biochem Biophys.* 282: 132-40.
- Simonetti N, Strippoli V, Cassone A. (1974). Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans*. *Nature.* 250: 344-6
- Skalhegg BS, Tasken K. (1997). Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 2: d331-42. Review.
- Sonneborn A, Bockmuhl DP, Gerads M, Kurpanek K, Sanglard D, Ernst JF. (2000) Protein kinase A encoded by TPK2 regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol Microbiol.* 35:386-96.
- Skowronski, R y Feldman, D. (1989). Characterization of an estrogen-binding protein in yeast *Candida albicans*. *Endocrinology* 124 (4): 1965-1972
- Stewart PR, Rogers PJ. «The filamentous fungi». 1978. Vol. 3, Cap. 9. Eds. Smith y Berry. Pag. 456.
- Studier FW, Moffatt BA. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 189: 113-30.
- Sudbery PE. (2001). The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Mol Microbiol.* 41: 19-31.
- Sutherland EW, Rall TW (1958). Fractionation and characterization of a cyclic adenosine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 232: 1077-1091.
- Sutherland EW, Wosilait WD. (1955). Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* 175: 169-170
- Takio K, Smith SB, Krebs EG, Walsh KA, Titani K. (1984). Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type II adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase.

- Biochemistry. 23: 4200-6.
- Taylor SS, Knighton DR, Zheng J, Ten Eyck LF, Sowadski JM. (1992). Structural framework for the protein kinase family. *Annu Rev Cell Biol.* 8: 429-462
- Taylor SS, Radzio-Andzelm E. (1994). Three protein kinase structures define a common motif. *Structure.* 2: 345-55. Review.
- Toda T, Uno I, Ishikawa T, Powers S, Kataoka T, Broek D, Cameron S, Broach J, Matsumoto K, Wigler M. (1985). In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell.* 40: 27-36
- Toda T, Cameron S, Sass P, Zoller M, Wigler M (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell.* 50:277-87.
- Uhler MD, McKnight GS. (1987). Expression of cDNAs for two isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 262: 15202-7.
- Ushinsky SC, Marcus D, Ash J, Dignard D, Marcil A, Morchhauser J, Thomas DY, Whiteway M, Leberer E. (2002). CDC42 is required for polarized growth in human pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell.* 1: 95-104
- Vigil, D, Blumenthal, DK, Brown, S, Taylor SS, Trehwela J (2004) Differential effect of substrate on type I and type II PKA holoenzyme dissociation. *Biochemistry.* 43: 5629- 36.
- Viste K, Kopperud RK, Christensen AE, Doskeland SO (2005) Substrate enhances the sensitivity of type I protein kinase A to cAMP. *J. Biol. Chem.*
- Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. (1968). An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 243: 2867-2873
- Walsh DA, Ashby CD, Gonzalez C, Calkins D, Fischer EH. Krebs EG. (1971). Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J Biol Chem.* 246: 1977-85.
- Whitehouse, S, Feramisco, J. R., Casnellie, J. E., Krebs, E. G., & 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.
- Whiteway M, Dignard D, Thomas DY. (1992). Dominant negative selection of heterologous genes: isolation of *Candida albicans* genes that interfere with *Saccharomyces cerevisiae* mating factor-induced cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89: 9410-4
- Yang S, Fletcher WH, Johnson DA. (1995). Regulation of cAMP-dependent protein kinase: enzyme activation without dissociation. *Biochemistry* 34: 6267-71.
- Zelada, A., Castilla, R., Passeron, S. & Cantore M. L. (1996). Reassessment of the effect of glucagon and nucleotides on germ tube formation in *Candida albicans*, *Cell. Mol. Biol.* 42: 567-576.
- Zelada, A., Passeron, S., Lopez Gomes, S. & 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: 254-252.
- Zelada A, Castilla R, Passeron S, Giasson L, Cantore ML. (2002). Interactions between regulatory and catalytic subunits of the *Candida albicans* cAMP-dependent protein kinase are modulated by autophosphorylation of the regulatory subunit. *Biochim. Biophys. Acta.* 1542 :73-81
- Zhao J, Hoye E, Boylan S, Walsh DA, Trehwella J. (1998). Quaternary structures of a catalytic subunit-regulatory subunit dimeric complex and the holoenzyme of the cAMP-dependent protein kinase by neutron contrast variation. *J. Biol. Chem.* 273: 30448-59
- Zheng J, Knighton DR, Xuong N, Taylor SS, Sowadski J, Ten Eyck LF. (1993). Crystal structure of the myristylated catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase reveal open and closed confirmation. *Protein Science* 2: 1559-1573
- Zick SK, Taylor SS. (1982). Interchain disulfide bonding in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase I. *J Biol Chem.* 257: 2287-93.
- Zoller MJ, Taylor SS. (1979). Affinity labeling of the nucleotide binding site of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase using p-fluorosulfonyl-[¹⁴C]benzoyl 5'-adenosine. Identification of a modified lysine residue. *J Biol Chem.* 254: 8363-8.

