Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Licenciatura

Estudio del comportamiento de los análogos : Sp-cAMPS, Sp-8-BR-cAMPS, Rp-cAMPS y Rp-8-BR-cAMPS sobre la vía de transducción de señales del AMPc, en sistemas eucariontes inferiores

Mizyrycki, Cynthia L.

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Mizyrycki, Cynthia L.. (). Estudio del comportamiento de los análogos : Sp-cAMPS, Sp-8-BR-cAMPS, Rp-cAMPS y Rp-8-BR-cAMPS sobre la vía de transducción de señales del AMPc, en sistemas eucariontes inferiores. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000616_Mizyrycki

Cita tipo Chicago:
Mizyrycki, Cynthia L.. "Estudio del comportamiento de los análogos : Sp-cAMPS, Sp-8-BR-cAMPS, Rp-cAMPS y Rp-8-BR-cAMPS sobre la vía de transducción de señales del AMPc, en sistemas eucariontes inferiores". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .
http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000616_Mizyrycki

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

"ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LOS ANÁLOGOS: Sp-cAMPS, Sp-8-BR-cAMPS, Rp-cAMPS Y Rp-8-BR-cAMPS SOBRE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DEL AMPc, EN SISTEMAS EUCARIONTES INFERIORES"

Autora: **Cynthia Liliana Mizyrycki**

Directora: **Dra. Silvia Margarita Moreno de Colonna**
Codirectora: **Lic. Elba Pereyra**

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FCEN - UBA
- SEPTIEMBRE DE 1998 -

Nº 616

Me complace expresar aquí los siguientes agradecimientos:

- A mis padres, por quererme. Por haberme guiado con el amor más sincero. Por haber luchado a mi lado y con esfuerzo para que mi educación fuese siempre de excelencia.
- A Dani, mi hermano, por su enorme corazón. Por haberme tendido su mano bondadosa cuando más lo necesitaba. Por bancarme y dejarme estar cerca suyo.
- A Silvia Moreno, por su hermosa calidad humana. Por su infinita tolerancia. Por su inquietud y excelencia académicas. Por todo lo demás, que ahora pasa por mi mente y me alegra, aunque no hay lugar ni palabras para escribirlo.
- A mis compañeras de laboratorio, en general, por ser un grupo humano de una calidez que no abunda. A Elba, mi guía de cerquita, por sus enseñanzas y su cariño. Por sus oídos bien dispuestos y sus sabios consejos. Por formarme y buscar siempre lo mejor para mí. A Silvia Rossi, a Vani y a María Rosa, por lo bueno de compartir el labo con gente linda. Por la dulzura cotidiana y por la ayuda cuando hizo falta.
- A la gran familia de vecinos: Edu, Ceci, Luciana, Mariela y Alejandra, por darme siempre todas las manos / consejos que les pedí y por los almuerzos y fiestas compartidos que siempre son más agradables junto a ellos. A Ceci, por haberme ayudado con el Graph Pad, dándome el último empujón que necesitaba para decidirme a hacer los gráficos como quería. A Edu, por sus consejos de buen corazón.
- A Martín Giurfa, por permitirme disfrutar de trabajar un ratito a su lado, bajo su guía. Por apoyarme desinteresadamente en lo que decidiera. Por su genialidad y su calidad humana excelentes.
- A Gise y a Lula, por lo que las hace ser casi como mis hermanas.
- A Luisita, por su ayudón con los Resultados confiando en mis plazos más que yo misma... y por su amistad.
- A Luciana, por su amistad y su cariño (...y por haberme ganado sus celos).
- A Gus Gudes, por ser algo así como un buenazo hermano mayor.
- A Lore, Chapi, Cata. A Gastón, a Frodo, a las Paulas, a Armando, y a todos los que no nombro y me acompañaron y compartieron conmigo buenos y malos momentos, en fin, vida, durante estos largos años de carrera.

♦ A Fabio, muy especial. Por ser feliz al compartir conmigo estos últimos pasos de la carrera. Por llevarme de la mano a su lado, con dulzura.

Esta investigación fue realizada con ayuda de una beca de la Fundación Antorchas, concurso 1995 de Becas para Estudiantes Destacados de Ciencias y Humanidades.

ÍNDICE

PÁGINA N°

ABREVIATURAS 8

RESUMEN 10

INTRODUCCIÓN

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES POR AMPc 13

FIGURA A 15

PLANTEOS DE INTERÉS PARA NUESTRAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN "

MODELOS BIOLÓGICOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

- *Mucor rouxii* 16
- *Saccharomyces cerevisiae* "

PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc 17

- PKA de *M. rouxii* 18
- PKA de *S. cerevisiae* 19

FOSFODIESTERASA DE AMPc "

- PDE de *M. rouxii* 20
- PDE de *S. cerevisiae* "

GRADO DE AVANCE DE LAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN DEL LABORATORIO

- *M. rouxii* 21
- *S. cerevisiae* 23

AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LA ACCIÓN DEL AMPc "

INHIBIDORES DE PKA CONOCIDOS 24

DESCRIPCIÓN DE LOS ANÁLOGOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO 25

FIGURA B 26

OBJETIVOS DEL TRABAJO 27

HIPÓTESIS "

MATERIALES Y MÉTODOS

1- PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO 29

1.1- *Mucor rouxii* "

1.1.1- Obtención de esporas y mantenimiento de la cepa "

1.1.2- Cultivos

A) Preparación de cultivos para las purificaciones enzimáticas "

B) Preparación de cultivos para observación del efecto *in vivo* de los análogos de AMPc "

PÁGINA N°

1.2- *Saccharomyces cerevisiae*
1.2.1- Mantenimiento de las cepas 30
1.2.2- Cultivos
A) Preparación de cultivos para las purificaciones enzimáticas y para la obtención de células permeabilizadas "
B) Cultivos en medio sólido para observación del efecto *in vivo* de los análogos de AMPc "
2- PURIFICACIONES ENZIMÁTICAS
2.1- *Mucor rouxii*
Preparación de PKA y PDE parcialmente purificadas 31
2.2- *Saccharomyces cerevisiae*
2.2.1- Preparación de PKA parcialmente purificada "
2.2.2- Preparación de PDE parcialmente purificada 32
3- PREPARACIÓN DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS de *Saccharomyces cerevisiae* "
4- ENSAYOS ENZIMÁTICOS
4.1- Medición de la actividad de PDE 33
4.2- Medición de actividad ligante de AMPc "
4.3- Medición de la actividad de PKA 34
A) De enzima parcialmente purificada "
B) De células permeabilizadas "
5- MEDICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO "
6- DOSAJE DE PROTEÍNAS
6.1- Proteínas solubles 35
6.2- Proteínas totales "
7- MEDICIÓN DE LA RADIACTIVIDAD "
8- MEDIOS DE CULTIVO "
9- BUFFERS 36
10- REACTIVOS 37
11- REALIZACIÓN DE LAS FIGURAS PRESENTADAS EN LOS RESULTADOS "
RESULTADOS
1) ENSAYOS DE COMPETENCIA POR LA HIDRÓLISIS DE [^{3}H]AMPc 40

PÁGINA N°

Tabla A IC_{50} obtenidos a partir de los gráficos de la figura 1 40
FIGURA 1 41
2) ENSAYOS DE COMPETENCIA DE LA UNIÓN DE [^{3}H]AMPc
A LA SUBUNIDAD R 42
Tabla B IC_{50} obtenidos a partir de los gráficos de la figura 2 43
FIGURA 2 44
3) ENSAYOS DE MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PKA 45
- *M. rouxii* "
- *S. cerevisiae* 46
PREPARACIONES DE PKA PARCIALMENTE PURIFICADAS "
FIGURA 3 47
FIGURA 4 48
FIGURA 5 49
LEVADURAS PERMEABILIZADAS "
Tabla C: Ensayos de medición de la actividad de la PKA. 51
4) PUESTA A PUNTO DE LOS ENSAYOS *IN VIVO*
SUSTENTO TEÓRICO DE LOS DISEÑOS IDEADOS 51
- *M. rouxii* 52
- *S. cerevisiae* 53
Tabla D 54
DISCUSIÓN
1) ENSAYOS DE COMPETENCIA POR LA HIDRÓLISIS DE [^{3}H]AMPc 57
2) ENSAYOS DE COMPETENCIA DE LA UNIÓN DE [^{3}H]AMPc
A LA SUBUNIDAD R 58
3) ENSAYOS DE MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PKA 59
CONCLUSIONES GENERALES 66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

ABREVIATURAS

AC	Adenilato Ciclasa
AMP	adenosin monofosfato
AMPc	3',5' - adenosin monofosfato cíclico
Análogos Sp	se refiere a los compuestos Sp y Sp8
Análogos Rp	se refiere a los compuestos Rp y Rp8
ATP	Adenosin trifosfato
C	Subunidad catalítica de la PKA
db-AMPc	análogo dibutiril AMPc
G_i	Proteína G heterotrimérica, inhibitoria de la AC
G_s	Proteína G heterotrimérica, estimulatoria de la AC
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
IC_{50}	Concentración para el 50 % de inhibición
K_d	Constante cinética de disociación
K_i	Constante cinética de inhibición
K_m	Constante de Michaelis-Menten
M. rouxii	*Mucor rouxii*
N^6-ben-AMPc	N-6-benzoiladenosina 3'-5'-AMPc
8-Br-AMPc	8-Bromo-AMPc
PDE	Fosfodiesterasa
PDEs	Fosfodiesterasas
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc
PKAs	Proteínas quinasas dependientes de AMPc
R	Subunidad regulatoria de la PKA
Rp	Rp-cAMPS: Rp-adenosin-3',5'-monofosforotioato cíclico
Rp8	Rp-8-Br-cAMPS: isómero Rp del 8-Bromoadenosin - 3', 5' - monofosforotioato cíclico
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SEM	Error estándar de la media
Sp	Sp-cAMPS: Sp-adenosin-3',5'-monofosforotioato cíclico
Sp8	Sp-8-Br-cAMPS: isómero Sp del 8-Bromoadenosin - 3', 5' - monofosforotioato cíclico

RESUMEN

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

- Ninguno de los análogos es hidrolizado por las PDEs de los organismos eucariontes inferiores utilizados en este estudio
- Los análogos Sp y Sp8 son agonistas de las PKAs de los organismos eucariontes inferiores utilizados en este estudio
- Los análogos Rp y Rp8 son antagonistas de las PKAs de los organismos eucariontes inferiores utilizados en este estudio

RESUMEN DE LOS RESULTADOS:

En los ensayos de competencia por la hidrólisis de [^{3}H]AMPc realizados en este trabajo se obtuvieron evidencias a favor de la hipótesis de la estabilidad de los análogos frente a la actividad hidrolítica de las PDEs de alta afinidad de ambos organismos eucariontes inferiores.

Los análogos Sp (Sp y Sp8) resultaron agonistas de las PKAs de ambos organismos, obtenidas por cualquiera de los métodos aquí practicados (PKAs parcialmente purificadas o bien levaduras permeabilizadas). Por su parte, los análogos Rp (Rp y Rp8) no activaron *per se* a la quinasa, obtenida de purificaciones parciales de *M. rouxii*, o bien de células permeabilizadas de *S. cerevisiae*. Dicha característica es consistente con su posible acción como antagonistas de la actividad de PKA. Sin embargo, se observó que lograron activar a la PKA de *S. cerevisiae* obtenida de extractos parcialmente purificados.

Cuando estuvo presente en los ensayos de activación de la PKA, además de los análogos, el agonista natural AMPc, los Sp fueron igualmente agonistas de las PKAs de ambos organismos. El Rp casi no logró inhibir la activación de la PKA por el AMPc a las mayores concentraciones ensayadas. El Rp8 logró una inhibición muy leve de la activación de la PKA por el AMPc a las mayores concentraciones ensayadas.

Ensayando la afinidad de los análogos por los sitios de unión en R, se observó que, a grandes rasgos, los análogos Rp fueron menos afines que los Sp y que el AMPc. Esto podría explicar, al menos en parte, su pobre efecto antagónico. Por el contrario, los análogos Sp presentaron mayor afinidad por los sitios de R lo que es coherente con el hecho de que logran influir sobre la actividad de PKA.

INTRODUCCIÓN

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES POR AMPc

En una amplia gama de organismos procariotas y eucariotas se ha probado la existencia de AMPc (Robison, G. A. & Sutherland, E.W., 1971; Botsford, J. L., 1981; Pall, M. L., 1981). En eucariotas el rol principal que se le atribuye es la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (McKnight, G. S., 1991; Thevelein, J. M., 1994). Menos frecuentemente, se lo ha descripto como agonista de ciertos canales iónicos (Hockberger, P. E. & Swandulla, D., 1987) y receptores de superficie celular (Gross, J. D.,1994; Kim, J. Y. *et al.*, 1996).

El AMPc se produce como mensajero intracelular de numerosas señales extracelulares que son captadas por receptores específicos de membrana (Figura A). Al recibir el mensaje éstos activan proteínas G heterotriméricas que tienen acopladas. A su vez, dichas proteínas transportan señales a través de la membrana hacia la adenilato ciclasa y pueden ser estimulatorias (G_s) o inhibitorias (G_i) de su actividad (Gilman, A. G., 1987).

La adenilato ciclasa (AC) es la enzima que amplifica la señal en el interior celular sintetizando AMPc a partir de ATP (Figura A). Se han identificado y descripto varias isoformas de AC. En mamíferos la mayoría de éstas está asociada a la membrana plasmática (Tang, W. J. & Gilman, A. G., 1992; Taussig, R. & Gilman, A.G., 1995) y responde a la regulación estimulatoria o inhibitoria por proteínas G; también se detectó actividad AC en bacterias (Tao, M. & Lipmann, F., 1969; Ladant, D., 1988; Bianchini, G. M. *et al.*, 1990), hongos (Khachatrian, L. *et al.*, 1987; Kataoka, T. *et al.*, 1985; Flawia, M. M. & Torres, H. N., 1972a; Flawia, M. M. & Torres, H. N., 1972b; Cantore, M. L. & Passeron, S., 1982), protozoarios (Torruella, M. *et al.*, 1986; Coso, O., 1993) y plantas (Carricarte, V. C. *et al.*, 1988).

La proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) fosforila proteínas que se encuentran río abajo, algunas de las cuales pueden tener actividad de quinasas, obteniéndose como resultado las cascadas de fosforilaciones (Krebs, E. G., 1993).

Las fosfatasas de fosfoproteínas (Figura A), al remover los fosfatos que fueron agregados por las quinasas, apagan la señal a este nivel (Hunter, T., 1995). Se ha observado la colocalización de quinasas y fosfatasas dada por asociación a la misma proteína de anclaje, postulándose la existencia de complejos de transducción de señales (Scott, J. D., 1997).

La desaparición de la señal de AMPc, como se muestra en la figura A, es llevada a cabo por las fosfodiesterasas de AMPc, que lo convierten en 5'- adenosina

monofosfato (5'-AMP). A su vez, se ha descripto el eflujo de AMPc en distintos sistemas eucariontes superiores y en células de metazoos (Barber, R. & Butcher, R. W., 1983) obtenido, posiblemente, mediante alguna forma de transporte activo (Rosenberg, P. A., 1992). Se desconoce la importancia de este último mecanismo en el apagado de la señal intracelular.

Los eucariotas inferiores unicelulares responden a señales nutricionales del ambiente, en general, mediante cascadas de transducción analogables a las que son disparadas por señales extracelulares en eucariotas superiores (Thevelein, J. M., 1994).

Se ha demostrado el rol del AMPc como segundo mensajero en eucariotas inferiores. Sin embargo, se conoce bastante poco sobre las primeras etapas que llevan al aumento de AMPc intracelular. Al igual que en eucariotas superiores, la gran mayoría de las acciones desencadenadas por AMPc está mediada por la actividad de la PKA (Thevelein, J. M., 1994).

Una de las pocas excepciones conocidas en la que una respuesta a AMPc no está mediada directamente por la PKA son los receptores de AMPc en *Dictyostelium discoideum*. Este hongo posee una familia de receptores que atraviesan la membrana capaces de unir AMPc (CAR1, CAR2, CAR3 y CAR4) acoplados a proteína G que sensan los cambios en el nivel de AMPc extracelular y son importantes en el control del desarrollo (Gross, J. D.,1994; Kim, J. Y. *et al.*, 1996). Además, se han descripto dos actividades ligantes de AMPc en *Saccharomyces cerevisiae*, diferentes de la subunidad regulatoria (R) de PKA. Estas proteínas fueron identificadas en vesículas de membranas plasmáticas de mutantes de *S. cerevisiae* que presentaban una disrupción en el gen *bcy1* que codifica para R (Müller, G., & Bandlow, W., 1991). Sin embargo, aunque ya ha sido secuenciado todo el genoma de *S. cerevisiae*, dichas proteínas no han sido asociadas con ningún gen particular.

En células procariotas la única función conocida del AMPc es la de estimular la transcripción de varios operones por unión a una proteína denominada CAP (catabolite gene activator protein) o CRP (AMPc receptor protein) (Shabb, J. B. & Corbin, J. D., 1992).

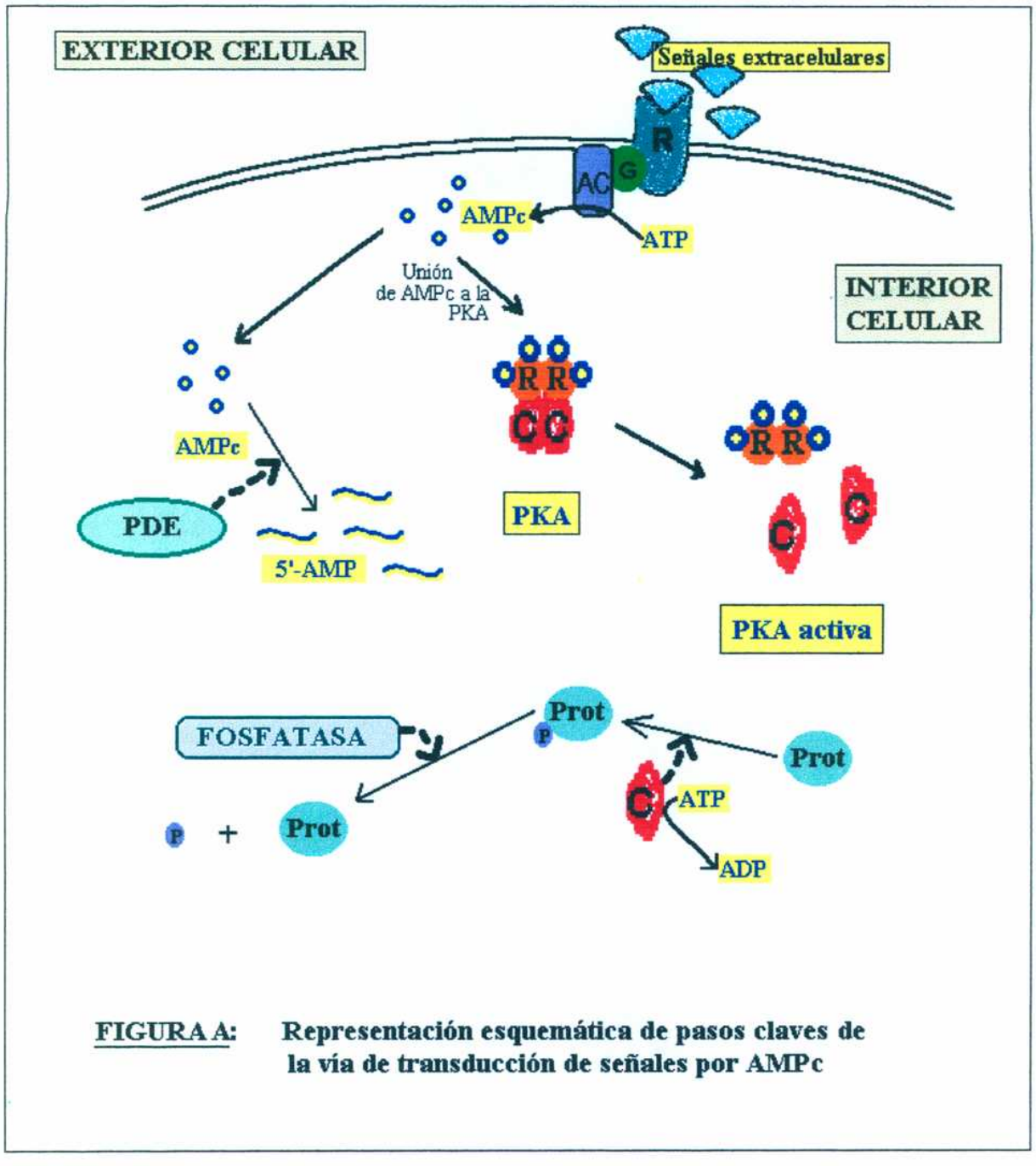


FIGURA A: **Representación esquemática de pasos claves de la vía de transducción de señales por AMPc**

PLANTEOS DE INTERÉS PARA NUESTRAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

El interés de nuestro laboratorio está centrado en dilucidar los mecanismos de activación de la PKA y la forma en que ésta media la transducción de la señal de AMPc en sistemas eucariontes inferiores. Los modelos utilizados son el hongo *Mucor rouxii* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para estos objetivos resulta interesante conocer los pasos inmediatos a la activación de PKA *in vivo* por un determinado estímulo, es decir, el o los primeros sustratos fosforilados por ella; así

sería posible simplificar la detección del estado de activación de la PKA mediante la medición del estado de fosforilación de sus sustratos endógenos específicos. También sería de interés encontrar parámetros morfológicos medibles *in vivo* que sean consecuencia directa de la actividad de la PKA, permitiendo observar diferencias morfológicas durante el desarrollo de las estructuras al alterar la actividad de la enzima.

MODELOS BIOLÓGICOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

Mucor rouxii

Las especies del género *Mucor* pertenecen a la división *Amastigomycota*, subdivisión *Zygomycotina*, clase *Zygomycetes*, orden *Mucorales*, familia *Mucoraceae*.

Los zigomicetes comparten la propiedad que los caracteriza que es la producción de zigosporas. Además de ellas, pueden producir otros dos tipos de esporas: artrosporas y esporangiosporas.

Al cultivar esporangiosporas aeróbicamente en un medio con glucosa, se da inicialmente un período de crecimiento esférico. Luego, de las células esféricas surgen las hifas en forma de cortas proyecciones denominadas tubos germinativos; a partir de éstos y por extensión apical, se desarrolla una estructura multinucleada no septada tubular conocida como hifa cenocítica (Orlowski, M., 1991).

Saccharomyces cerevisiae

Las especies del género *Saccharomyces* pertenecen al filum *Ascomycota*, clase *Ascomycetes*, orden *Saccharomycetales*, familia *Saccharomycetaceae*.

El grupo *Saccharomycetales* se caracteriza por la carencia de hifas ascógenas y de ascocarpos.

Saccharomyces cerevisiae es el miembro mejor estudiado de esta familia. Puede presentar células somáticas haploides o diploides y ambas se multiplican por gemación multilateral. Como especie heterotálica puede presentar dos tipos de sistemas de apareamiento, tipo a y tipo α. La fusión de dos células de tipo de apareamiento opuesto, que funcionan en este caso como gametangios, da como resultado la cigota (2n). Éstas geman y se dividen (generación diploide) hasta que bajo condiciones medioambientales desfavorables se diferencian a ascos que darán nuevamente esporas haploides (tipos a y α).

S. cerevisiae, en particular, es un modelo sumamente utilizado del que se conoce su genoma completo. La obtención y caracterización de mutantes de *S. cerevisiae* ha permitido identificar los principales genes responsables de distintos procesos, entre otros, el de transducción de señales por AMPc y el de regulación del ciclo celular (Alexopoulos, C. J. *et al.*, 1996).

PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc

La PKA es una enzima que cataliza la transferencia del grupo fosfato de la posición γ del ATP a un aminoácido (en general serina y, menos frecuentemente, treonina) de sus sustratos específicos (Taylor, S. & Radzio-Andzelm, E., 1994; Francis, S. H. & Corbin, J. D., 1994).

Los sustratos de PKA llevan una secuencia conservada de dos o más aminoácidos básicos hacia el lado amino terminal de la serina o treonina fosforilables, en las posiciones -2 y -3. A su vez, la fosforilación de los aminoácidos apropiados regula la actividad del sustrato proteico (Taylor, S. & Radzio-Andzelm, E., 1994; Walsh, D. A. & Van Patten, S. M., 1994).

La PKA de eucariontes superiores está compuesta por dos subunidades catalíticas monoméricas (C) y una subunidad regulatoria, dimérica (R), la cual contiene dos sitios de unión para AMPc por monómero.

Está aceptado que el mecanismo de activación de la PKA puede describirse por la siguiente ecuación:

$$R_2C_2 + 4\ AMPc \rightarrow R_2AMPc_4 + 2\ C$$

es decir, que la unión de las cuatro moléculas de AMPc a la subunidad R provocaría la disociación y consecuente activación de la enzima (Taylor, S. & Radzio-Andzelm, E., 1994). Un esquema de dicho mecanismo se representa en la figura A.

Existen varias isoformas enzimáticas de PKA en eucariontes superiores, designadas habitualmente como de tipo I y de tipo II. La subunidad R puede ser de tipo I (α o β) o de tipo II (α o β), siendo quien determina el nombre asignado a la forma de PKA. Hay identificadas tres formas de subunidad C en tejidos de mamíferos Cα, Cβ y Cγ. Así, la PKA puede constituirse con diferentes combinaciones, no habiéndose descripto asociación preferencial entre algún tipo particular de R con uno particular de C (Taylor, S. & Radzio-Andzelm, E., 1994; Tasken, K. *et al.*, 1997). Una diferencia fundamental entre las RI y las RII es que las segundas pueden ser fosforiladas por C (proceso denominado autofosforilación), con lo cual aumenta diez

veces la K_d de la holoenzima (Taylor, S. & Radzio-Andzelm, E., 1994). Además, se vio que la localización subcelular y distribución tisular son diferentes para las RI y las RII.

Cada monómero de R posee dos sitios de unión de AMPc que pueden diferenciarse como sitio 1 o B y sitio 2 o A de acuerdo a su especificidad para diferentes análogos de AMPc. El sitio A tiene preferencia por los análogos sustituidos en N-6 y C-6, mientras que el sitio B tiene preferencia por los sustituidos en C-8 (Døskeland *et al.*, 1993; Francis, S. H. & Corbin, J. D., 1994).

La subunidad catalítica de todas las proteínas quinasas comparte gran similitud de secuencia y de estructuras secundaria y terciaria. Existe un núcleo catalítico de aproximadamente 250 aminoácidos, común a todas las proteínas quinasas (Hanks, S. K. *et al.*, 1988).

Se han descripto, a nivel genético, quinasas dependientes de AMPc en organismos eucariotas inferiores. En *S. cerevisiae* (Toda, T. *et al.*, 1987a), *D. discoideum* (Mutzel, R. *et al.*, 1987), *C. elegans* (Lu, X. Y. *et al.*, 1990), *B. emersonii* (Marques, M. do V. & Gomes, S. L., 1992), *U. maydis* (Gold, S. *et al.*, 1994) y *N. crassa* (Bruno, K. S. *et al.*, 1996) se describió un solo gen que codifica para la subunidad R. En *M. rouxii* se está clonando el gen de R, teniendo secuenciados los sitios A y B de unión para AMPc (Rossi, S., manuscrito en preparación). Para la subunidad C se describió un solo gen en *C. elegans* (Gross, R. E. *et al.*, 1990) y *B. emersonii* (de Oliveira, J. C. *et al.*, 1994), dos genes para la PKA de *U. maydis* (Durrenberger, F. *et al.*, 1998) y tres genes para *S. cerevisiae* (Toda, T. *et al.*, 1987b). En *N. crassa* se describió un gen que codifica para una quinasa dependiente de AMPc (Yarden, O. *et al.*, 1992).

Por ensayos bioquímicos se ha descripto además actividad quinasa dependiente de AMPc en *N. crassa* (Glikin, G. C. *et al.*, 1982), *T. cruzi* (Ulloa, R. M. *et al.*, 1988), *S. platensis* (Silberstein, S. *et al.*, 1990), *U. maydis* (Kerner, N. & Passeron, S., 1984), *P. tetraurelia* (Hochstrasser, M. & Nelson, D. L., 1989), *C. albicans* (Zelada, A. *et al.*, 1998), *M. rouxii* (Moreno, S. & Passeron, S., 1980).

PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc DE *M. rouxii*

La PKA del hongo *M. rouxii* es una enzima tetramérica, R_2C_2 , con peso molecular aproximado de 240 KDa para la holoenzima, 75 KDa para la subunidad R y 41 KDa para C (Pastori, R. *et al.*, 1985).

Al igual que en eucariotas superiores, se determinó la existencia de dos sitios de unión de AMPc por monómero de subunidad regulatoria, existiendo cooperatividad positiva entre ellos (Paveto *et al.*, 1989).

Se demostró también la existencia de una forma de holoenzima dimérica, que se denominó R'C cuyo peso molecular es de 88.000. Se la encontró en cultivos de fase estacionaria, y se la pudo obtener también por proteólisis limitada de la holoenzima nativa. Se determinó que el peso molecular de R' es de 38 Kd (Paveto *et al.*, 1989).

PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE AMPc DE *S. cerevisiae*

La PKA de *S. cerevisiae* es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades regulatorias (R) y dos catalíticas (C).

Existen tres genes que codifican para la subunidad catalítica de la PKA de *S. cerevisiae* que son *tpk1*, *tpk2* y *tpk3* (Toda, T. *et al.*, 1987b). Se ha demostrado que las levaduras que llevan sólo uno de los genes que codifican para C son viables (Toda, T. *et al.*, 1987b), mientras que la disrupción de los tres genes es letal (Thevelein, J.M., 1992)

Por otro lado, sólo hay un gen para la R, *sra1 / bcy1*, que tiene un 40 % de homología con la RII de mamíferos, esencialmente en las zonas de unión al AMPc, de interacción con la subunidad catalítica y en el dominio de fosforilación (Toda *et al.*, 1987a). La disrupción del gen *bcy1* muestra un fenotipo de características similares al obtenido con alta actividad de PKA (Toda *et al.*, 1987a; Toda *et al.*, 1987b; Cannon, *et al.*, 1990).

FOSFODIESTERASA DE AMPc

La fosfodiesterasa (PDE) de AMPc es la enzima que cataliza su hidrólisis convirtiéndolo en 5'-adenosina monofosfato (5'-AMP).

Se han hallado múltiples formas de PDE en eucariotas superiores (Beavo *et al.*, 1982; Beavo, J. A., 1995), plantas (Shimoyama, M. M. *et al.*, 1971), bacterias (Appleman, M. M. *et al.*, 1973), hongos (Londesborough, J. & Suoranta, K., 1988; Maia, J. C. & Camargo, E. P., 1974; Galvagno, M. A. *et al.*, 1979) y protozoarios (Ulloa, R., 1988). Las formas difieren en cantidad, localización subcelular, afinidad y especificidad por los sustratos, respuesta a efectores y mecanismos de regulación (Beavo, J. A., 1995).

En los últimos años se ha hallado una gran diversidad de isoenzimas que componen al menos siete familias génicas diferentes de fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos en tejidos de mamíferos. Cada familia posee una estructura, localización celular y regulación características. Entre estas familias, la clase IV de fosfodiesterasas de mamíferos está constituida por aquellas que son específicas para AMPc (Beavo, J. A., 1995).

FOSFODIESTERASA DE AMPc DE *M. rouxii*

En *M. rouxii* existe al menos una PDE soluble, de peso molecular 57 KDa, específica y de alta afinidad por el AMPc (K_m = 0,9 μM), que requiere Mg^{2+} o Mn^{2+}. La fosforilación dependiente de AMPc, así como la proteólisis controlada provocan un aumento de la actividad, siendo ambos procesos complementarios más que aditivos (Galvagno *et al.*, 1979; Moreno *et al.*, 1982). Esta PDE posee características cinéticas y farmacológicas similares a las de tipo IV de mamíferos, es decir, específica y de alta afinidad para AMPc e insensible al GMPc (Tomes, C., 1991).

FOSFODIESTERASA DE AMPc DE *S. cerevisiae*

S. cerevisiae contiene dos PDEs capaces de hidrolizar AMPc: una de alta K_m (0,1 mM) para AMPc y GMPc, citosólica, dimérica, con subunidades de 43 KDa, independiente de metales bivalentes, codificada por el gen *pde1* (Nikawa, J. *et al.*, 1987), y otra de baja K_m (170 nM), específica para AMPc, débilmente asociada a microsomas, monomérica, de peso molecular 61 KDa, dependiente de metales bivalentes (Mg^{2+})y codificada por el gen *pde2* (Sass, P. *et al.*, 1986); esta enzima no es estimulada ni inhibida por GMPc y se asemeja a las PDEs de clase IV de mamíferos. Mutantes de *pde1*, deficientes en actividad de PDE1, acumulan AMPc intracelular por encima de los niveles basales encontrados en cepas salvajes, pero no tienen impedido el crecimiento (Uno, I. *et al.*, 1983).

Se demostró que mutantes que poseían una mejor captación de AMPc del medio, tenían alterado el gen de la PDE2. Esto indica que dicha enzima podría estar protegiendo a las células contra la intrusión de AMPc externo (Thevelein, J .M., 1994).

GRADO DE AVANCE DE LAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN DEL LABORATORIO

Respecto de los mecanismos de activación de PKA se obtuvo una serie de resultados mediante el estudio de ambos modelos:

M. rouxii: utilizando como modelo la PKA de este hongo, se han obtenido las siguientes evidencias que sugieren que la activación de altas concentraciones de holoenzima (como ocurren en el interior de la célula) es altamente dependiente de otros factores además del AMPc, y que sería posible que la holoenzima fuera activa sin necesidad de disociación. 1) cantidades de enzima parcialmente activadas con kemptido (LR_2ASLG), ATP/Mg^{2+} y AMPc 10 µM son completamente activadas cuando se utilizan histona o protamina como sustratos; 2) policationes tales como: histonas, poli-L-lisina o poliaminas pueden estimular la activación parcial obtenida con kemptido (Guthmann, *et al.*, 1990). Se investigó la participación del sustrato proteico en la activación de concentraciones altas de la PKA por AMPc. Se caracterizaron, en primera instancia los parámetros cinéticos (V_{max} y K_m) de diecisiete péptidos frente a la subunidad catalítica aislada de la PKA de *M. rouxii*. Se seleccionaron tres péptidos sustratos de la PKA: kemptido (LR_2ASLG), péptido S_6 ($KR_3LSSLRA$) y R_4ASVA para estudiar el comportamiento de la holoenzima frente al AMPc. Se determinó que: 1) la $A_{0.5}$ para la activación por AMPc depende de la cantidad de enzima utilizada en el ensayo; 2) que la $A_{0.5}$ para el AMPc, usando la misma cantidad de enzima, es diferente según el péptido usado como sustrato lográndose los menores valores con el péptido S_6; 3) el péptido inhibidor de la quinasa inhibe la PKA de *M. rouxii* (+ AMPc) a concentraciones mayores que las necesarias para inhibir la subunidad catalítica (C) libre; 4) La relación de actividades de la PKA de *M. rouxii* con cinco sustratos peptídicos diferentes con respecto a protamina, varía con la cantidad de enzima (0.1 - 10 nM) y con la concentración de AMPc y es diferente con respecto a la relación de actividades utilizando subunidad C libre. Esta diferencia es más pronunciada a mayor concentración de PKA. (Zaremberg, V. *et al.*, manuscrito en preparación).

Hemos encontrado, además, que la activación de PKA por análogos sitio específicos es altamente dependiente de la concentración de enzima (Pereyra, E. *et al.*, manuscrito en preparación).

Se ha demostrado la participación de esta enzima en las primeras etapas de la germinación de esporas de *M. rouxii* inoculadas en medio de cultivo con glucosa, a través de la medición de los niveles de AMPc y de las subunidades catalítica y

regulatoria de la PKA durante esta etapa (Rossi, S., & Moreno, S., 1994). Se han identificado proteínas fosforiladas en serina cuyo patrón de fosforilación varía a lo largo de la germinación (Rossi, S., 1995). Respecto de la emisión del tubo germinativo, se hallaron varias evidencias que sugieren que estaría regulada por la cascada de transducción de señales mediada por AMPc (Rossi, S., 1995; Pereyra, E. *et al*, 1992). Esto deja abiertas dos posibilidades: que la emisión del tubo germinativo se de como consecuencia de la fosforilación de un sustrato proteico de PKA (regulación positiva), o bien que dicha emisión sea el resultado de la presencia de un sustrato de PKA en estado desfosforilado, al menos en los sitios consenso para PKA (regulación negativa).

Se sabe que la presencia sostenida de db-AMPc (Pereyra, E. *et al.*, 1992) o de análogos específicos de sitio 2 de la PKA, como son los sustituidos en N-6 (Pereyra, E. *et al.*, manuscrito en preparación), en cultivos de *M. rouxii* en medio definido con glucosa como fuente de carbono, impide la emisión del tubo germinativo sin afectar el crecimiento general, que se produce en forma isodiamétrica. Se ha observado que en todos los casos en que se impide el crecimiento polarizado (emisión del tubo germinativo) por el agregado de análogos de AMPc, se produce una disminución en los niveles de C mientras que los niveles de R permanecen constantes, obteniéndose una relación R/C mayor que la normal (sin droga) que es aproximadamente 1. También se observó que estos mismos tratamientos provocan un aumento de 7 a 10 veces en los niveles de AMPc intracelular.

A partir de estas observaciones puede sugerirse la hipótesis de que la activación sostenida de la PKA, producida por los altos niveles de AMPc intracelular, conduce a su disociación y posterior inactivación de la subunidad C, posiblemente por proteólisis (Pereyra, E. *et al.*, manuscrito e preparación). En este fenómeno de disminución regulada, la subunidad C disminuye, R permanece constante y por lo tanto el cociente R/C aumenta. De consideraciones cinéticas planteadas por Døskeland (Houge *et al.*, 1990) se deduce que en esta situación no sólo hay menos C disponible, sino que esa cantidad de C remanente requiere mayores concentraciones de AMPc para su activación; habría más R disponible para captar al AMPc cuando C disminuye, haciendo más difícil su disociación. Una explicación posible del fenómeno de no emisión sería que los niveles de AMPc no lograran contrarrestar la situación, estando así impedida la fosforilación de sustratos proteicos de PKA. Entonces, la imposibilidad para emitir el tubo germinativo podría estar dada por la inhibición de la

actividad de PKA obtenida como consecuencia del agregado de los análogos de AMPc, avalando la hipótesis de la necesidad de una proteína fosforilada en sitios consenso para PKA como desencadenante de la emisión hifal.

Sin embargo, es posible que los niveles elevados de AMPc medidos basten para provocar una activación sostenida de la PKA, lo que permitiría que sus sustratos estén fosforilados reforzando en este caso la hipótesis de la necesidad de un sustrato desfosforilado para la emisión hifal.

Sería muy importante disponer de buenos inhibidores de la actividad de PKA o de su activación para discernir entre estos posibles mecanismos de emisión del tubo germinativo.

S. cerevisiae: se dispone de 6 cepas de *S. cerevisiae* con mutaciones puntuales o disrupciones en la subunidad R (*bcy1*) de la PKA y con un fondo genético de *ras2-*. La mutación en el gen *ras2* trae aparejada una serie de defectos nutricionales (Thevelein, J. M., 1992), que son compensados en parte o totalmente por las mutantes *bcy1* (Cannon *et al.*, 1990). En el laboratorio se ha demostrado (Zaremberg, V. & Moreno, S., 1996) que la reversión parcial o total de estos fenotipos no se debe a que haya una sobreexpresión de subunidad catalítica libre, ni a que la afinidad de las mutantes de R por el AMPc esté aumentada, sino que se manifiesta igual en ausencia casi total de AMPc, lograda por sobreexpresión de la PDE de AMPc de alta afinidad homóloga. Por lo tanto, es probable que la activación aparentemente facilitada de la PKA en estas cepas surja de la interacción de las holoenzimas mutadas con los sustratos, sin necesidad de la intervención del AMPc . Estos indicios permitirían inferir que C es capaz de mantener un estado catalíticamente activo sin la necesidad de disociarse de R. Es decir que es probable que el ranking de los fenotipos de estas mutantes *sra1* refleje el estado de fosforilación de sustratos de PKA y que este estado sea variable, dependiendo de un defecto progresivo en uno o más aspectos de la función de la subunidad R.

AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LA ACCIÓN DEL AMPc

Hasta el momento no se conocen compuestos que logren un franco efecto antagónico al del AMPc para *M. rouxii* ni para *S. cerevisiae*, y es bastante general la carencia de antagonistas capaces de actuar a concentraciones suficientemente bajas como para asegurar la especificidad del efecto en el resto de los eucariontes inferiores.

Para todos los abordajes utilizados en nuestras líneas sería muy útil contar con herramientas bioquímicas que permitiesen controlar el estado de activación de PKA. En particular, sería interesante disponer de un par agonista / antagonista que presente características similares para todo excepto para la activación de la PKA. Esto permitiría establecer correlaciones causales entre el estado de activación de PKA y el efecto medido.

INHIBIDORES DE PKA CONOCIDOS

Se han descripto drogas que actúan en sistemas eucariontes superiores como inhibidores de alta especificidad para PKA, cuyo mecanismo de acción es ser inhibidores competitivos del ATP en la subunidad catalítica. De éstas, las mejores son el KT 5720 y el H 89 dado que presentan K_i para PKA del orden de 50 nM, mientras que para el resto de las quinasas los valores de K_i son al menos dos órdenes de magnitud superiores (Irie, K. *et al.*, 1985; Chijiwa *et al.*, 1990). Como la región de unión de ATP está altamente conservada en todas las quinasas (Hanks, S. K. *et al.*, 1988) y dado que tanto db-AMPc como N^6-ben-AMPc ejercen importantes efectos morfológicos actuando sobre la vía de transducción mediada por PKA, decidimos ensayar el efecto de KT 5720 y H 89 sobre la morfología de *M. rouxii*. Ninguno de estos compuestos modificó el patrón normal de germinación (Pereyra, E. & Moreno. S, datos no publicados). Por lo tanto, analizamos la acción de estos compuestos sobre PKA parcialmente purificada de *M. rouxii* y obtuvimos en ambos casos valores de K_i del orden de 10 μM (Pereyra, E. & Moreno. S, datos no publicados). Por el mecanismo de acción de estas drogas (mencionado más arriba) la dosis necesaria para inhibir a la PKA de *M. rouxii* es demasiado alta como para actuar específicamente sobre la PKA. Lo más probable es que a dicha concentración la acción de estos compuestos sea inespecífica y afecte a otras quinasas además de la PKA, así como sucede en eucariontes superiores.

Existe, además, una proteína natural inhibidora de la PKA, la PKI, que fue aislada de muchos tejidos de mamíferos. Se la describió como un potente inhibidor termoestable capaz de unirse a la subunidad C libre de la PKA por medio de un sitio de pseudosustrato cuyas interacciones y características son similares a las que poseen los sustratos específicos de PKA (Walsh, D. A. *et al.*, 1990).

Se han comercializado péptidos inhibidores de la PKA derivados de la secuencia del PKI. El PKI(6-22)amida resultó ser el de máxima potencia inhibitoria

para la PKA de mamíferos. Se probaron ese y otros péptidos inhibidores sobre C_1 de *S. cerevisiae* y se comprobó que ejercían una inhibición mucho menor que sobre C_α de mamíferos (Glass, D., *et al.*, 1992). La misma baja afinidad fue encontrada en experimentos utilizando la C de *M. rouxii* (Zaremberg, V., Pereyra, E. & Moreno. S, datos no publicados).

La afinidad de C por la PKI, por los péptidos inhibidores y por los sustratos en general en eucariotas inferiores es menor que en superiores (Glass, D., *et al.*, 1992; Zaremberg, V. *et al.*, manuscrito en preparación). Esto podría explicar la baja potencia inhibidora de la PKI y sus péptidos derivados en dichos sistemas.

DESCRIPCIÓN DE LOS ANÁLOGOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

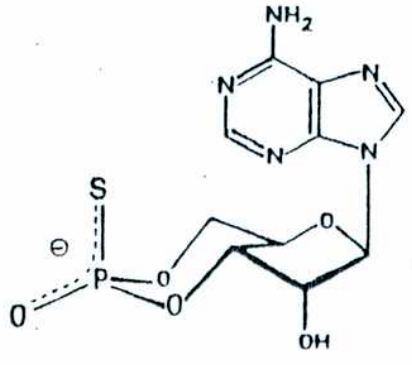
En la Figura B puede observarse la estructura de los compuestos utilizados en este estudio.

El AMPcS es un análogo del segundo mensajero natural AMPc en el cual uno de los dos átomos de oxígeno exocíclicos en el fosfato cíclico está reemplazado por un azufre (Jastorff, B. & Krebs, T., 1972; Dostmann, W., 1987; Genieser *et al*, 1988). La tio-sustitución ecuatorial origina el isómero R-, mientras que la modificación axial origina el isómero S -. Dicha sustitución confiere a estos derivados mayor lipofilicidad que la del AMPc (dado que poseen mayor log K'_w, según Schaap, P. *et al.*, 1993, ver tabla), resistencia a la hidrólisis por la PDE (Van Haastert, P. *et al.*, 1983; Eckstein, F., 1985; Braumann, T. *et al.*, 1986) y acciones opuestas como agonistas / antagonistas de los efectos mediados por AMPc (Rothermel, J. D. *et al.*, 1983; Van Haastert, P. *et al.*, 1984; Van Haastert, P. *et al.*, 1987; Buchler, W. *et al.*, 1988; Adashi, E. *et al.*, 1990).

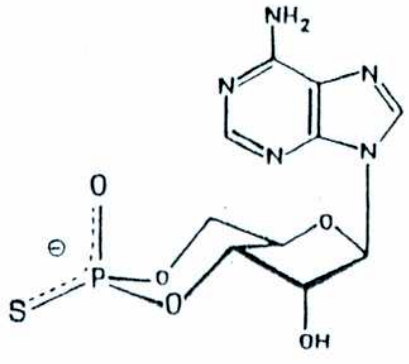
El Rp-AMPcS es un inhibidor competitivo (antagonista del AMPc) para las proteínas quinasas A (tipos I y II), no es metabolizado intracelularmente ni hidrolizado por las fosfodiesterasas (PDEs) de mamíferos dependientes de nucleótidos cíclicos. Su permeabilidad es comparable a la del 8-Br-AMPc.

El Sp-AMPcS es un activador de PKA (tipos I y II). Es más resistente a la degradación por las PDE que el db-AMPc y que el 8-Br-AMPc. No presenta, efectos metabólicos secundarios. Tiene también una permeabilidad similar a la del 8-Br-AMPc.

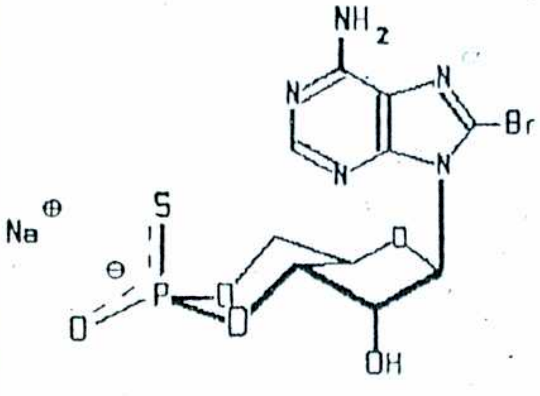
La sustitución con un Br en el carbono 8 de la adenosina genera el par Sp-8 y Rp-8. Estos compuestos poseen el doble de lipofilicidad que los no bromados.



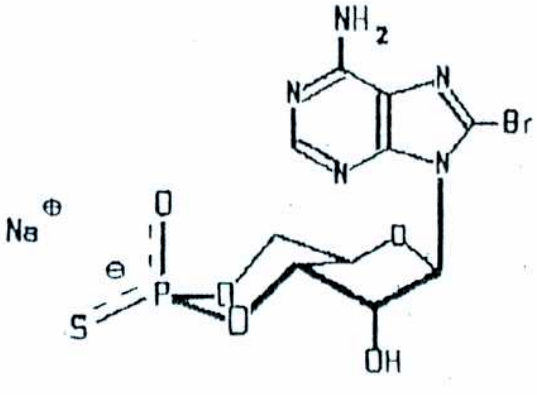
Sp - cAMPS



Rp - cAMPS



Sp - 8 - Br - cAMPS



Rp - 8 - Br - cAMPS

FIGURA B: **Estructura de los análogos del AMPc utilizados**

OBJETIVOS DEL TRABAJO

- Averiguar si todos los análogos son estables frente a la actividad hidrolítica de la PDE de eucariontes inferiores.
- Investigar si los compuestos Sp y Sp8 se comportan como agonistas de la PKA de dichos organismos.
- Investigar si los compuestos Rp y Rp8 se comportan como antagonistas de la PKA de organismos eucariontes inferiores.

Para llevar a cabo dichos objetivos se decidió probarlos en las dos especies de eucariontes inferiores que utilizamos en el laboratorio: *M. rouxii* y *S. cerevisiae.* Se realizaron ensayos de competencia por la hidrólisis de [^{3}H] AMPc por la PDE de alta afinidad (estabilidad a la degradación). Se observó la competencia de los análogos por los sitios de unión de AMPc en R y se ensayó su acción sobre la activación de PKA en preparaciones parcialmente purificadas de la enzima y en células permeabilizadas.

HIPÓTESIS

- Ninguno de los análogos es hidrolizado por las PDEs de los organismos eucariontes inferiores utilizados en este estudio
- Los análogos Sp y Sp8 son agonistas de las PKAs de los organismos eucariontes inferiores utilizados en este estudio
- Los análogos Rp y Rp8 son antagonistas de las PKAs de los organismos eucariontes inferiores utilizados en este estudio

MATERIALES Y MÉTODOS

1- PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

1.1- *Mucor rouxii*:

Se utilizó la cepa NRRL 1894, obtenida originalmente por el Dr. W. C. Hesseltine y cedida a la Dra. Passeron por el Dr. Roger Storck.

1.1.1- Obtención de esporas y mantenimiento de la cepa:

El mantenimiento de la cepa y la obtención de las esporas utilizadas para el cultivo del hongo, fueron hechos de acuerdo a lo descripto por Haidle y Storck (Haidle, C.W. & Storck, R., 1966), en agar - jugo de tomate.

1.1.2- Cultivos:

A) Preparación de cultivos para las purificaciones enzimáticas:

Las esporas fueron inoculadas a $5x10^5$ esp/ml en medio YPG, previo recuento en cámara de Neubauer. Una preparación típica comprende 500 ml de medio de cultivo en Erlenmeyers de 2 l. Luego de 14-16 hs de crecimiento en un agitador rotatorio a 100 rpm y a 28 °C (fase logarítmica), los cultivos fueron cosechados por filtración a través de papel Whatman N° 1, lavados exhaustivamente con agua destilada fría y molidos con N_2 líquido, hasta obtener un polvo fino que fue procesado inmediatamente. Se obtuvieron en general 5 gr. de micelio a partir de 500 ml de medio.

B) Preparación de cultivos para observación del efecto *in vivo* de los análogos de AMPc:

Las esporas fueron inoculadas a $1x10^6$ esp/ml en medio definido, previo recuento en cámara de Neubauer. Se cultivó a 28°C, en tubos de ensayo y con agitación un volumen final de 0,5 ml durante 4 horas, alcanzándose un estado de células crecidas que aun no emitieron el tubo germinativo. Seguidamente, se agregó el análogo a concentraciones finales variables según el ensayo y se continuó con la incubación observándose el efecto sobre la morfología y tiempo de emisión del tubo germinativo.

Un segundo procedimiento seguido, fue igual al recién descripto hasta el punto del agregado del análogo, posterior a lo cual se continuó con la incubación 15 minutos

más y se filtró al vacío con filtro de nitrocelulosa de 0,45 µm. De esta forma, se eliminó el análogo del medio de cultivo. El material filtrado se resuspendió en medio fresco, se prosiguió con la incubación por 30 a 60 minutos, y se observaron los mismos parámetros arriba mencionados.

1.2- *Saccharomyces cerevisiae*:

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas:

Cepa	Genotipo
KT1115	*Mat α leu2 ura3-52*
KT1127	*Mat α leu2 ura3-52 bcy1-14*
JC302-26B	*Mat α leu2 ura3-52 his4-539 RAS2::LEU2*

Las cepas fueron provistas gentilmente por Kelly Tatchell del LSU Medical Center, Shreveport, Louisiana, USA.

1.2.1- Mantenimiento de las cepas:

Las levaduras se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio sólido YPD - agar y se cultivaron en estufa a 30°C. Se realizaron repiques cada dos meses.

Las cepas stocks se guardaron en una solución de glicerol 20 %, a -70 °C.

1.2.2- Cultivos:

A) Preparación de cultivos para las purificaciones enzimáticas y para la obtención de células permeabilizadas:

Se creció *Saccharomyces cerevisiae* (cepa salvaje) en medio YPD. Los erlenmeyers fueron incubados en un agitador rotatorio a 100 rpm y a 28 °C, hasta alcanzada la fase exponencial de crecimiento (A_{600} ~ 0,5). Las levaduras se recogieron por filtración o centrifugación.

B) Cultivos en medio sólido para observación del efecto *in vivo* de los análogos de AMPc:

Se utilizaron placas estériles de cuatro pocillos a los cuales se les agregó 0,5 ml de medio YPD - agar. En los casos en que se crecieron las levaduras en presencia de análogos, la concentración final de los mismos se alcanzó agregándolos al medio

antes de que solidificara, cuidando que la temperatura no fuese muy elevada (aproximadamente 40 °C). Las placas se incubaron a 30°C durante una noche.

2- PURIFICACIONES ENZIMÁTICAS

2.1- *Mucor rouxii*:

Preparación de PKA y PDE parcialmente purificadas:

Todos los pasos que se detallan se realizaron a 4°C. El polvo de micelio obtenido según se describe en **1.1.2- A)**, se extrajo con dos volúmenes de buffer GB, con agitación suave durante 20 min. Se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min. El sobrenadante (S10) fue cromatografiado en una columna de DEAE-Sepharosa en una relación de 20 mg de proteína por ml de resina.

La columna fue lavada con dos volúmenes de buffer GB y eluída con dos concentraciones de NaCl en GB, 0,12 y 0,35 M, dos volúmenes en cada caso; se tomó la fracción correspondiente a 0,35 M de NaCl , la cual se concentró con $(NH_4)_2SO_4$ al 80% de saturación. En este paso la enzima fue guardada en alícuotas a -20° C.

Las dos actividades enzimáticas coeluyen.

2.2- *Saccharomyces cerevisiae*:

2.2.1- Preparación de PKA parcialmente purificada:

Todo el procedimiento se realizó a 4 °C. Las levaduras obtenidas según **1.2.2- A)** se molieron en mortero con dos volúmenes de arena hasta obtener una pasta que se extrajo con 1 volumen de buffer de extracción por 20 min. Se centrifugó 10 min. a 5000 rpm. Se agregó al sobrenadante de centrifugación sulfato de estreptomicina hasta llegar a una relación de 0,75% p/v. Se precipitó agitando suavemente con barrita magnética durante 10 minutos y dejando reposar 50 minutos. Se centrifugó 15 minutos a 10000 rpm. El sobrenadante se mezcló con un volumen de solución saturada de $(NH_4)_2SO_4$ (50% de saturación) y se dejó reposar por 15 minutos. Se centrifugó 15 minutos a 10000 rpm y se guardó el precipitado a -20 °C hasta su utilización.

2.2.2- Preparación de PDE parcialmente purificada:

Todo el procedimiento se realizó a 4°C. La pasta de levadura obtenida como en **2.2.1-** se extrajo con dos volúmenes de buffer GB, con agitación suave durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante de una centrifugación de 10 minutos a 7000 rpm, en el cual se determinaron proteínas por el método de Bradford para someterlo a una cromatografía de intercambio iónico. Para ello se utilizó una columna de DEAE-Sepharosa equilibrada con buffer GB en la que se sembró el sobrenadante de centrifugación a razón de 30 mg de proteína por ml de resina. Se obtuvieron cinco fracciones:

- percolado + lavado: se obtuvo uniendo el percolado con el lavado (un volumen de buffer GB)
- 0.1, 0.2, 0.3, y 0.4 M de NaCl en GB: se obtuvieron eluyendo con dos volúmenes de las soluciones de cada concentración

Se ensayó la actividad fosfodiesterásica en cada fracción encontrándose la máxima en el percolado + lavado. Ésta se precipitó con $(NH_4)_2SO_4$ al 80% de saturación. El precipitado formado se recogió por centrifugación a 10000 rpm, se fraccionó en alícuotas y se guardó a -20 °C hasta su uso.

3- PREPARACIÓN DE CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *S. cerevisiae*

El procedimiento de permeabilización se realizó de acuerdo al previamente descripto en Maggese *et al.*, 1982. Las células ($0.5\text{-}2\times10^9$) provenientes de cultivos de levaduras en fase exponencial de crecimiento, fueron resuspendidas en 1 ml de buffer de permeabilización al cual se le agregó 150 µl de una mezcla tolueno:etanol (1:4, v/v) y se agitó vigorosamente con vortex 5 veces durante 1 min. alternando cada vez con 30 segundos de frío (4 °C). Las células fueron centrifugadas inmediatamente con microcentífuga 2 minutos a 10000 rpm, lavadas una vez y resuspendidas en el mismo buffer. Estas células así tratadas fueron usadas dentro de la hora de hecho el tratamiento de permeabilización. El contenido proteico se determinó por el método de Lowry, luego de solubilizar las muestras en NaOH 1M por 1 hora a 100 °C.

4- ENSAYOS ENZIMÁTICOS:

4.1- Medición de la actividad de PDE:

Se siguió el método en dos etapas modificado por Thompson *et al.* (1974), en la mezcla habitual de ensayo descripta por Kerner *et al.* (1984) conteniendo buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, 2-mercaptoetanol 10 mM, 50µg de seroalbúmina bovina, $MgCl_2$ 10 mM, [^{3}H]AMPc 2 µM (100000 cpm) y la enzima, en un volumen final de 100 µl. La enzima se desaló antes de usar por cromatografiado de los precipitados de $(NH_4)_2SO_4$, a través de columnas Sephadex G-25 equilibradas en buffer GB. La mezcla se incubó a 30 °C durante 20 minutos deteniéndose la reacción por calentamiento a 100 °C durante un minuto. En esta etapa, por la acción de la PDE, el [^{3}H]AMPc se linealiza a 5'-[^{3}H]AMP. Después de enfriar se agregó 25 µg de veneno de serpiente (*Ophiophagus hannah*) y se incubó por 10 minutos a 30 °C. Este veneno, con su actividad 5'-nucleotidasa, hidroliza el 5'-[^{3}H]AMP (cargado negativamente) produciendo [^{3}H]adenosina (neutra). La mezcla de incubación se colocó en hielo y se agregó 1,1 ml de una suspensión de Dowex AGI-X2 en metanol 50 % (1:2), dejando 15 minutos en frío y agitando periódicamente. Con ello la [^{3}H]adenosina fue separada del [^{3}H]AMPc remanente por resina de intercambio aniónico. Finalmente se centrifugaron los tubos de reacción y se ensayó la radiactividad de 0,5 ml del sobrenadante en mezcla centelleadora de Arkopal-tolueno. En el sobrenadante se encuentra la [^{3}H]adenosina, que es una medida de la hidrólisis de [^{3}H]AMPc por la PDE.

En todos los casos se ajustaron las condiciones de ensayo para que las reacciones fueran lineales con el tiempo y el consumo de sustrato no superara el 25%.

4.2- Medición de actividad ligante de AMPc:

La medición se basó en la capacidad de la subunidad R de unir AMPc.

Para esto alícuotas de preparaciones conteniendo 50-150 µg de proteína total fueron incubados con 0,5 µM [^{3}H]AMPc (10^4 cpm/pmol), 0,5 M NaCl en Tris-HCl 15 mM pH 7,0. Luego de 30 min de incubación a 30 °C se filtraron alícuotas por nitrocelulosa de 0,45 µm. Los filtros fueron lavados con grandes volúmenes de Tris-HCl 15 mM pH 7, se secaron y la radiactividad fue contada con solución centelleadora de tolueno (Moreno *et al.*, 1983).

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

4.3- Medición de la actividad de PKA:

A) De enzima parcialmente purificada:

La medición de actividad se realizó utilizando kemptido (LR_2ASLG) como sustrato y en condiciones lineales de concentración de proteínas. La enzima se desaló inmediatamente antes de ser usada por cromatografiado de los precipitados de $(NH_4)_2SO_4$, a través de columnas conteniendo Sephadex G-25 equilibradas en buffer GB. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 70 µl conteniendo buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 , 2-mercaptoetanol 2 mM, $MgCl_2$ 10 mM, [γ-^{32}P]ATP 50 µM (300-1000 cpm/pmol), kemptido 63 µM, la enzima y AMPc 10 µM en el ensayo estandard o lo indicado en cada experimento.

Luego de incubar 10 min a 30 °C las reacciones se detuvieron por frío (4 °C); se sembraron 50 µl en papeles de fosfocelulosa (Whatman P-81) de 2x2 cm, que fueron lavados con ácido fosfórico 75 mM, 3 veces, 5 min cada vez, y una última vez con etanol. Los papeles fueron secados y se determinó la radiactividad en solución centelleadora de tolueno (Roskoski, 1983).Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

B) De células permeabilizadas:

El ensayo se desarrolló como en **4.1- A)**, con las siguientes modificaciones:

- alícuotas conteniendo entre 1-3 x 10^7 células por tubo se utilizaron en reemplazo del extracto enzimático
- las incubaciones fueron de 2 minutos a 30°C
- después de la incubación se agregó albúmina sérica bovina a una concentración final de 3,6 µg/µl e inmediatamente se hirvió durante 30 segundos
- se centrifugó y se sembraron alícuotas del sobrendante en papeles de fosfocelulosa

5- MEDICIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE GLUCÓGENO

La acumulación de glucógeno en *Saccharomyces cerevisiae* se analizó *in situ* por inversión de las placas crecidas como se indica en **1.2.2- B)** sobre un tanque cromatográfico conteniendo cristales de I_2 (Cannon *et al*, 1986).

6- DOSAJE DE PROTEÍNAS

6.1- Proteínas solubles:

Las proteínas solubles se dosaron por el método de Bradford (Bradford, 1976), usando seroalbúmina bovina como patrón.

6.2- Proteínas totales:

La proteína celular total se determinó por el método de Lowry , como se describe en Lowry *et al* (1951), luego de solubilizar las muestras en NaOH 1M por 1 hora a 100 °C. También se usó seroalbúmina bovina como proteína patrón.

7- MEDICIÓN DE LA RADIOACTIVIDAD.

Se determinó la radiación β en contador de centelleo líquido, usando mezcla centelleadora de tolueno. Para las muestras en soluciones acuosas se usó una mezcla de tolueno-Arkopal N 100 (3:1) (v/v).

La mezcla centelleadora de tolueno contiene 0,1 gr de dimetil POPOP[1,4 bis 2(4-metil-5-feniloxazolilbenceno)] y 4 gr de PPO (2,5-difeniloxazol) en un litro de tolueno.

8- MEDIOS DE CULTIVO

Medio definido: consiste en una solución de sales minerales suplementadas con vitaminas (Bartnicki-García, S. & Nickerson, W. J., 1962) y 2% de glucosa como fuente de carbono.

Medio YPG: medio complejo con 0,3% de extracto de levadura, 1% de peptona, 3% de glucosa (Bartnicki-García, S. & Nickerson, W. J., 1962)

Medio YPD: consiste en una solución que contiene 2% de bactopeptona, 1% de extracto de levadura y 2% de glucosa (Sherman *et al.* 1981).

Medio YPD - Agar: se prepara la solución de YPD añadiendo un 2% de agar.

Todos los medios se esterilizaron mediante autoclavado.

9- BUFFERS

Buffer GB:

Tris-HCl	10 mM, pH 7,4
2-mercaptoetanol	10 mM
EDTA	1mM
EGTA	1 mM
p-metil- sulfonil fluoruro	0,5 mM

Buffer de extracción:

K_2HPO_4-KH_2PO_4	50 mM, pH 6,8
EDTA	5 mM
EGTA	3 mM
NaCl	120 mM
2-mercaptoetanol	10 mM
p-metil sulfonil fluoruro	1mM
antipaína	3 µg/ml
benzamidina	1 mM

Buffer de permeabilización:

Tris- HCl	40 mM, pH 7.4
EGTA	0.5 mM
benzamidina	1 mM
antipaína	3 µg/ml
PMSF	1 mM

10- REACTIVOS

Los análogos del AMPc, es decir el Sp, el Sp8, el Rp y el Rp8 fueron una gentil donación del Dr. Hans Genieser, del Biolog Life Science Institute de Bremen, Alemania.

El [^{3}H]AMPc (Actividad específica 30 Ci/mmol), y el [γ-^{32}P]ATP (A.E. 6000 Ci/mmol) fueron de New England Corp.

Los demás análogos de AMPc, los nucleótidos, el kemptido, las resinas de intercambio DEAE-Sepharosa, Dowex AGI-X2, los inhibidores de proteasas, el veneno de serpiente (*Ophiophagus hannah*), seroalbúmina bovina cristalina fracción V (BSA), Tris, EDTA, EGTA, PPO, dimetil POPOP, 2-mercaptoetanol, fueron de Sigma Chemical Co.

El sulfato de amonio y el cloruro de sodio fueron de Carlo Erba.

El papel de fosfocelulosa fue Whatman P-81.

La nitrocelulosa de 0,45 µm fue de Micron Separating Inc.

El Arkopal N100 fue donado por Química Hoechst.

El resto de los reactivos fue de grado analítico.

11- REALIZACIÓN DE LAS FIGURAS PRESENTADAS EN LOS RESULTADOS

- Gráficos realizados a partir de los datos obtenidos para los Ensayos de Competencia por la hidrólisis de [^{3}H]AMPc por las PDEs

Las curvas graficadas en la figura 1 se obtuvieron realizando un ajuste teórico de los datos individuales a una ecuación que describe la competencia de la unión de un ligando radioactivo a un único sitio de unión, con competidores no marcados. Los puntos corresponden a las medias y las barras de error a los errores estándar de las medias (SEM).

Para el ajuste cada dato se consideró individualmente y el algoritmo minimizó la suma de los cuadrados de las distancias reales entre los datos y la curva. Se alcanzó la convergencia cuando dos iteraciones consecutivas cambiaron la suma de los cuadrados por menos del 0.01 %.

- Gráficos realizados a partir de los datos obtenidos para los Ensayos de Competencia por la unión de [^{3}H]AMPc a la subunidad R de las PKAs

M. rouxii : Las curvas graficadas en la figura 2 A se obtuvieron realizando un ajuste teórico de los datos individuales a una ecuación que describe la competencia de la unión de un ligando radioactivo a dos sitios de unión (de igual afinidad *por el* radioligando), con competidores no marcados. Los puntos corresponden a las medias y las barras de error a los errores estándar de las medias (SEM).

Para el ajuste cada dato se consideró individualmente y el algoritmo minimizó la suma de los cuadrados de las distancias relativas entre los datos y la curva. Se alcanzó la convergencia cuando dos iteraciones consecutivas cambiaron la suma de los cuadrados por menos del 0.01 %.

S. cerevisiae : para la figura 2 B se procedió de manera similar que con *M. rouxii* pero se pidió que el algoritmo minimizara las distancias reales entre los datos y la curva ya que con esta opción las curvas obtenidas resultaron mejor ajustadas a los puntos correspondientes a las medias.

- Gráficos realizados a partir de los datos obtenidos para los Ensayos de Activación de las PKAs

La mayor parte de las curvas de la figura 3 se obtuvo realizando un ajuste teórico de los datos individuales a una ecuación de dosis - respuesta de tipo sigmoidea. Los puntos corresponden a las medias y las barras de error a los errores estándar de las medias (SEM).

Para el ajuste cada dato se consideró individualmente y el algoritmo minimizó la suma de los cuadrados de las distancias reales entre los datos y la curva. Se alcanzó la convergencia cuando dos iteraciones consecutivas cambiaron la suma de los cuadrados por menos del 0.01 %.

Las curvas de AMPc de la figura 3 A, Sp8 de la figura 3 B y Sp y Sp8 de la figura 3 C, no mostraron un buen ajuste a una ecuación sigmoidea como era de esperarse dada la inhibición de la actividad de PKA que presentan a altas concentraciones de dichos compuestos. En esos casos, los datos se ajustaron por métodos alternativos para suavizar las curvas presentadas.

RESULTADOS

1) ENSAYOS DE COMPETENCIA POR LA HIDRÓLISIS DE [^{3}H]AMPC

Una manera de abordar el estudio de la estabilidad de los compuestos a la degradación por las PDEs es ver si son buenos competidores de la hidrólisis de [^{3}H]AMPc.

En estos ensayos se usaron PDEs parcialmente purificadas de *M. rouxii* y *S. cerevisiae*. Para ambos sistemas se graficaron los resultados de al menos dos experimentos independientes. En la figura 1 se ilustra, para ambos sistemas, el porcentaje de [^{3}H]AMPc hidrolizado por la PDE de alta afinidad respecto del control sin competidor, en función de concentraciones micromolares crecientes de los análogos no radioactivos. Como se explica en Materiales y Métodos, a partir de los datos se realizó un ajuste a una curva teórica de competencia de la unión de un ligando radioactivo a un único sitio de unión, con competidores no marcados. La curva obtenida en cada sistema se graficó y de ella se obtuvieron los valores aproximados de IC_{50} para 2 μM de [^{3}H]AMPc que figuran en la Tabla A.

Vemos que el comportamiento de los derivados es muy diferente para los dos sistemas biológicos:

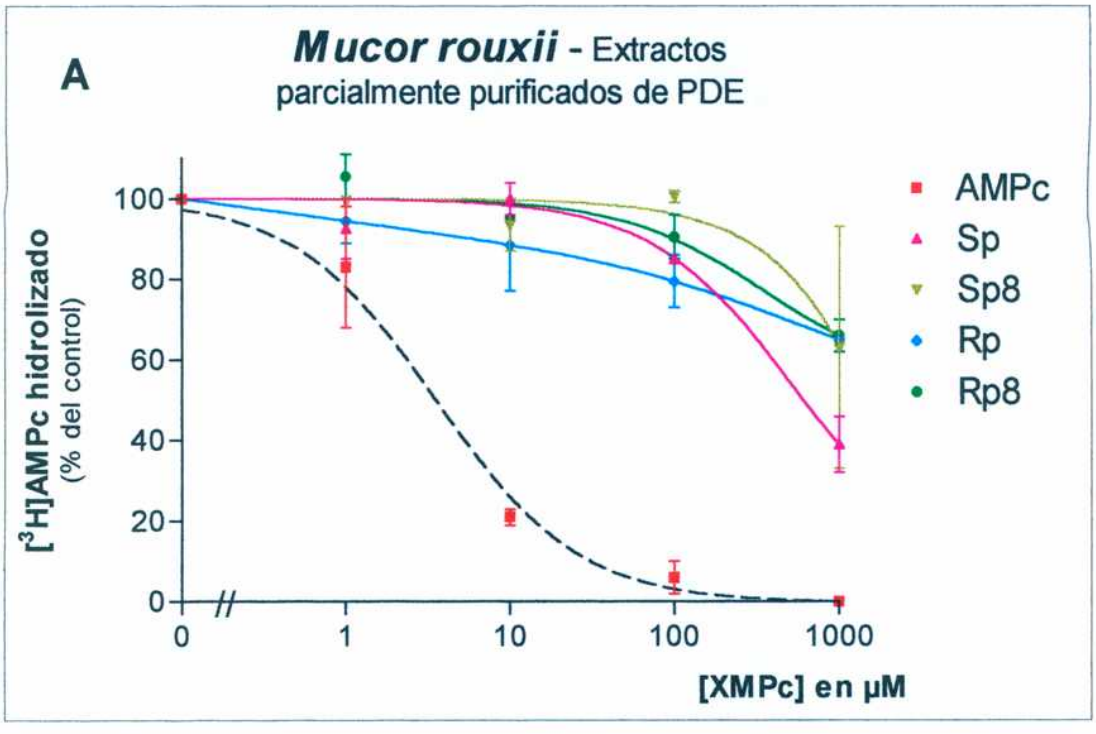
- ***M. rouxii*** (fig. 1 A): los análogos no logran competir la hidrólisis de [^{3}H]AMPc 2 μM sino hasta concentraciones tan altas como 1mM. Los IC_{50} de todos los derivados son más de dos órdenes de magnitud superiores al del AMPc lo que significaría que la afinidad de la PDE por los compuestos es mucho menor que la que presenta por el AMPc.
- ***S. cerevisiae*** (fig. 1 B): aquí todos los compuestos compiten en mayor o menor grado la hidrólisis. Los IC_{50} correspondientes se muestran en la tabla A.

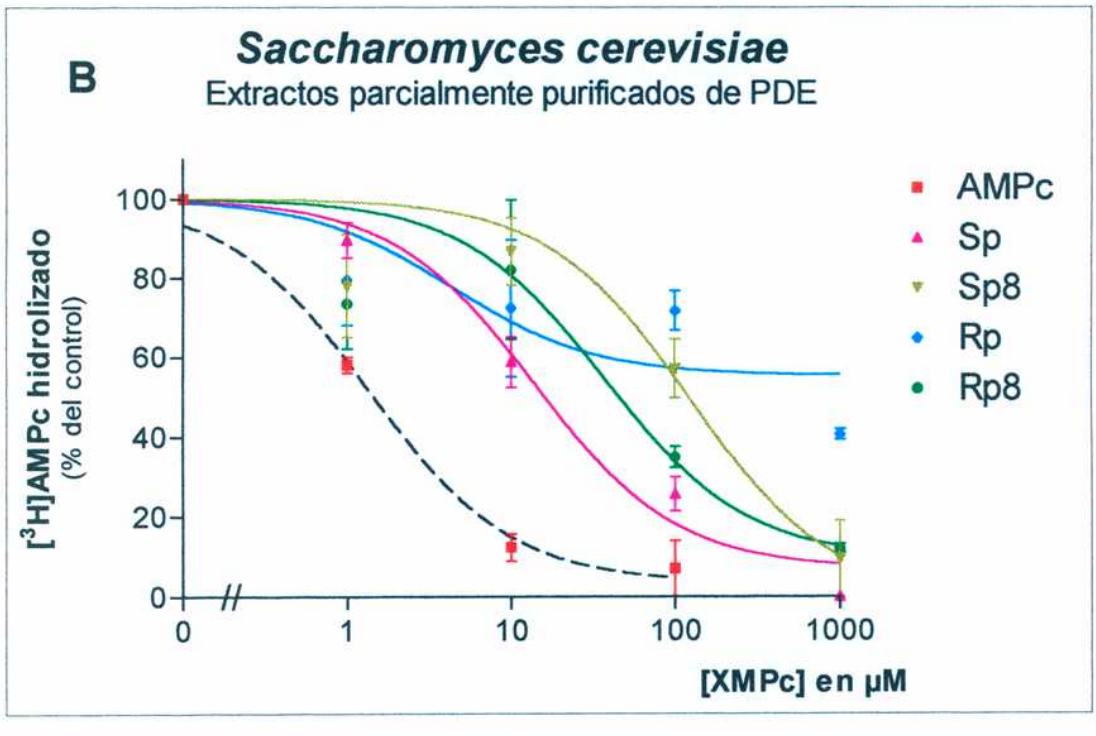
El control con AMPc no radioactivo muestra la inhibición esperada, habiéndose obtenido, en ambos sistemas, IC_{50} cercanos a 2 μM.

Tabla A: Ensayos de competencia por la hidrólisis de 2 μM de [^{3}H]AMPc
IC_{50} obtenidos a partir de las curvas de la figura 1 (valores aproximados)

	M. rouxii	*S. cerevisiae*
AMPc	3.6 μM	1.5 μM
Sp	616.6 μM	16.2 μM
Sp8	> 1 mM	120.2 μM
Rp	> 1 mM	> 1 mM
Rp8	> 1 mM	45.7 μM

FIGURA 1: Competencia por la hidrólisis de [^{3}H]AMPc por las PDEs de alta afinidad





2) ENSAYOS DE COMPETENCIA DE LA UNIÓN DE [^{3}H]AMPc A LA SUBUNIDAD R

Dado que los compuestos investigados son análogos estructurales del AMPc, el paso siguiente fue averiguar la potencia que tienen los mismos para competir con el AMPc por sus sitios de unión en la subunidad regulatoria de la PKA.

Para dichos experimentos se usaron PKAs parcialmente purificadas de *M. rouxii* y *S. cerevisiae*. Los ensayos fueron hechos en las condiciones descriptas en Materiales y Métodos, y los resultados se obtuvieron a partir de al menos 2 experimentos independientes para cada análogo (cada uno por duplicado).

En la figura 2 se observa la disminución en la unión de [^{3}H]AMPc a la subunidad R, por competencia con concentraciones crecientes de los análogos no radioactivos. Para agrupar las series de datos de los distintos análogos, los valores se expresaron como porcentajes de marca remanente respecto de la máxima obtenida en ausencia de competidor. Como se detalla en Materiales y Métodos, se realizó un ajuste a una curva teórica de competencia de la unión de un ligando radioactivo a dos sitios de unión (que presentan igual afinidad por el radioligando), con competidores no marcados, y se obtuvieron las curvas de dosis - respuesta de la figura 2. A partir de ellas se estimaron los IC_{50} aproximados para 0.5 μM de [^{3}H]AMPc que figuran en la Tabla B.

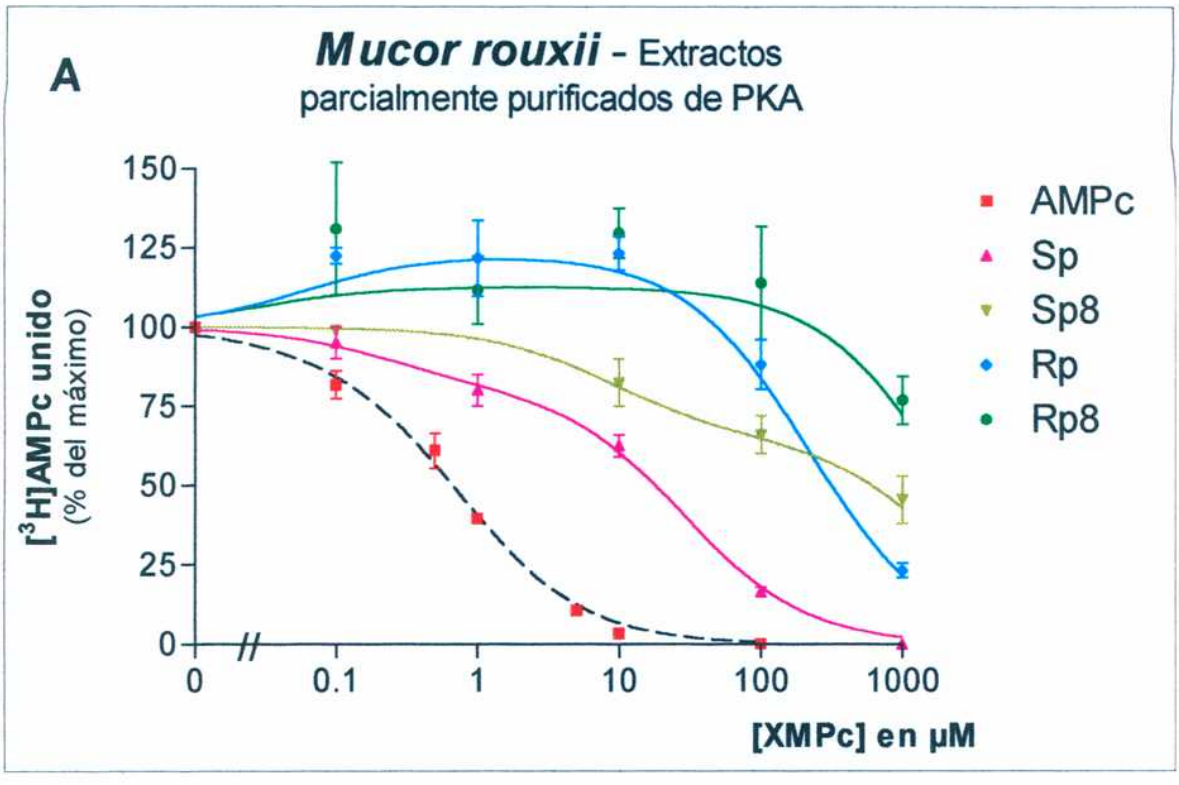
- ***M. rouxii*** (fig. 2 A): se observa que todos los análogos compiten la unión menos eficientemente que el propio AMPc. El Sp es buen competidor mostrando una afinidad 10 veces inferior y un perfil similar al del AMPc. Por el contrario, el resto de los análogos son peores en la competencia, como se desprende de observar los valores de IC_{50} que figuran en la tabla B.
- ***S. cerevisiae*** (fig. 2 B): en este sistema resalta el comportamiento del Sp8 que es mejor que el AMPc desplazando su marca. El Sp actúa de manera similar al AMPc, el Rp recién logra una buena competencia a concentraciones elevadas y el Rp8 tiene una afinidad intermedia.

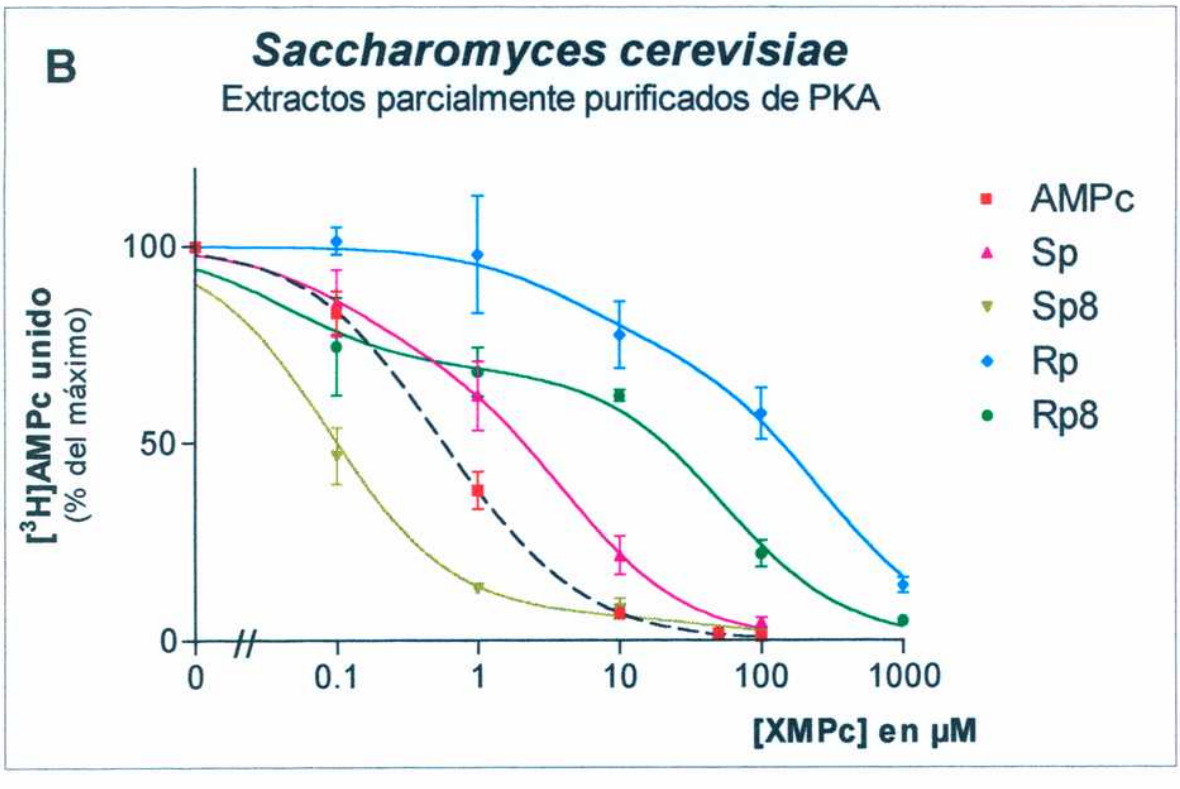
En ambos sistemas, el control con AMPc no radioactivo muestra la inhibición esperada, habiéndose obtenido IC_{50} aproximados de 0.5 μM.

Tabla B: Ensayos de competencia de la unión de 0.5 μM [^{3}H]AMPc a la subunidad R. IC_{50} obtenidos a partir de las curvas de la figura 2 (valores aproximados)

	M. rouxii	*S. cerevisiae*
AMPc	0.7 μM	0.6 μM
Sp	16.2 μM	2.1 μM
Sp8	602.6 μM	0.1 μM
Rp	316.2 μM	134.9 μM
Rp8	> 1 mM	20.9 μM

FIGURA 2: Competencia por la unión de [^{3}H]AMPc a la subunidad R de la PKA





3) ENSAYOS DE MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PKA

Para evaluar el comportamiento de los derivados del AMPc, ya sea como agonistas o antagonistas de la activación de las PKAs, se midió la actividad de las enzimas en presencia y en ausencia del agonista natural AMPc.

En las figuras 3, 4 y 5 se graficó el % de activación de PKA respecto del valor obtenido con una concentración fija de AMPc (tomado como referencia, es decir como 100%) y no respecto de la activación máxima de PKA (ver Discusión). Las curvas mostradas en la figura 3 se calcularon por ajuste de las series de datos a ecuaciones sigmoideas, salvo en los casos en que por dicho método no se logró un buen ajuste. En esos casos, que suelen ser los que presentan inhibición por alta concentración de nucleótido cíclico (ver fig. 3 A, curva AMPc ; fig. 3 B, curva Sp8 ; fig. 3 C, curvas Sp y Sp8), se ajustaron los datos por métodos alternativos para suavizar las curvas presentadas.

M. rouxii

Se midió la actividad de la PKA obtenida a partir de extractos parcialmente purificados según se indica en Materiales y Métodos. Se ensayó el efecto de los análogos del AMPc solos (figura 3 A) o junto con AMPc 10 μM (figuras 4 A y 5 A). Se realizaron como mínimo dos experimentos independientes para cada análogo (cada uno por duplicado).

A partir de las curvas obtenidas en 3 A se calcularon las $A_{0,5}$ aparentes ($A_{0,5}$ ap.) aproximadas, es decir las concentraciones de cada análogo que provocaron el 50 % de la actividad obtenida para AMPc 10 μM, que se observan en la Tabla C (ver columna: Preparaciones Enzimáticas, *M. rouxii*). Las $A_{0,5}$ ap. informadas en dicha tabla no deben considerarse como parámetros cinéticos, sino como valores necesarios para la comparación de las potencias relativas de los análogos en los distintos sistemas.

De estos resultados se desprende que los análogos Sp (es decir Sp y Sp8) son francos activadores de la PKA de *M. rouxii*, mientras que los Rp (o sea, Rp y Rp8) no la activan.

En las figuras 4 A y 5 A se pueden observar los resultados obtenidos al ensayar el efecto de los análogos actuando junto con AMPc. Puede verse en la figura 4 A que los Sp, ya sea solos o en presencia de AMPc, se comportan como

activadores de PKA. Los Rp (figura 5 A), al igual que lo visto en la figura 3 A, no activan *per se* a la quinasa. Sin embargo, no resultaron ser antagonistas potentes de la activación de PKA por el AMPc. El Rp no logra inhibir la activación de PKA producida por 10 μM de AMPc utilizándolo a concentraciones hasta 100 veces mayores que el AMPc, y el Rp8 recién presenta una leve tendencia inhibitoria a altas concentraciones.

S. cerevisiae

PREPARACIONES DE PKA PARCIALMENTE PURIFICADAS COMO FUENTE DE ENZIMA

Inicialmente se midió la actividad de PKA obtenida a partir de extractos parcialmente purificados midiendo en cada ensayo la acción de todos los compuestos en ausencia y presencia de AMPc. Sin embargo, con este sistema y luego de muchos intentos, no se logró una buena dependencia del AMPc para la activación de la enzima, es decir que la actividad en un ensayo sin AMPc (actividad basal) era cercana a la obtenida en presencia de AMPc, lográndose una pobre activabilidad de la enzima.

De los ensayos mencionados se consideraron los tres mejores en cuanto a la activabilidad de la PKA obtenida (con una actividad 2 a 3 veces mayor estimulando con AMPc respecto de la basal). Los resultados se muestran en las figuras 3 B, para los análogos solos, y 4 B y 5 B, para los análogos en presencia de AMPc 1 μM. En todos los gráficos se consideró como 100 % de actividad a la que se obtuvo con AMPc 1 μM. A partir de las curvas del gráfico 3 B se calcularon las $A_{0,5}$ ap. aproximadas que se muestran en la Tabla C (ver columna: Preparaciones Enzimáticas, *S. cerevisiae*).

Tanto en la figura 3 B como en la 4 B se observa que el Sp es un franco agonista de PKA, activándola en forma dosis dependiente. Puede verse también que el Sp8 es incluso más potente como activador que el Sp a bajas concentraciones, pasando a inhibir a la quinasa a concentraciones mayores. Respecto al comportamiento de los Rp, se observa que al utilizarlos solos (figura 3 B y 5 B) son agonistas de PKA y al incubarlos en presencia de AMPc (figura 5 B) no logran inhibir su activación.

FIGURA 3: Ensayos de Activación de PKA

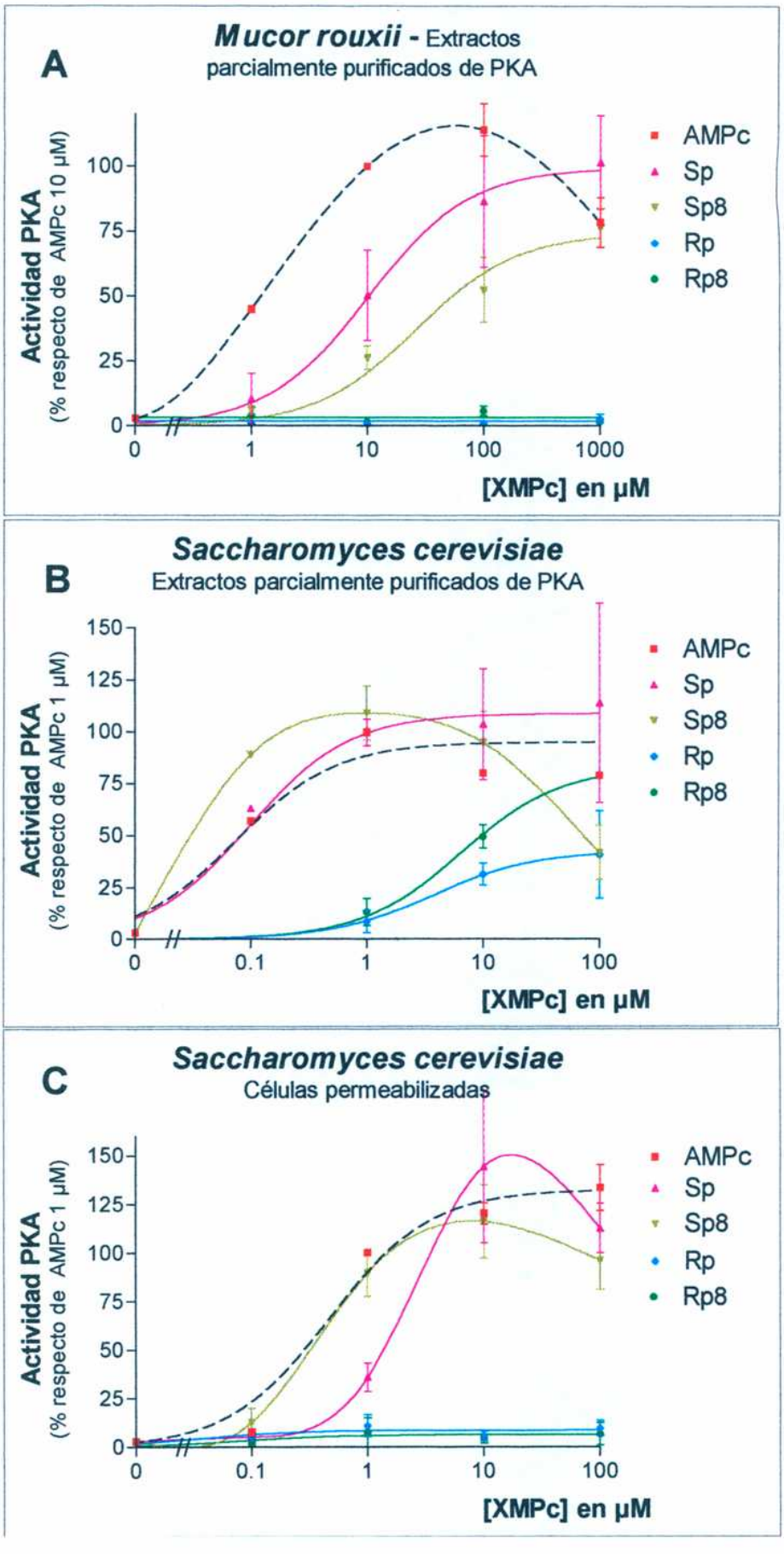


FIGURA 4: Ensayos de Activación de PKA en ausencia y presencia de AMPc. Análogos Sp y Sp8

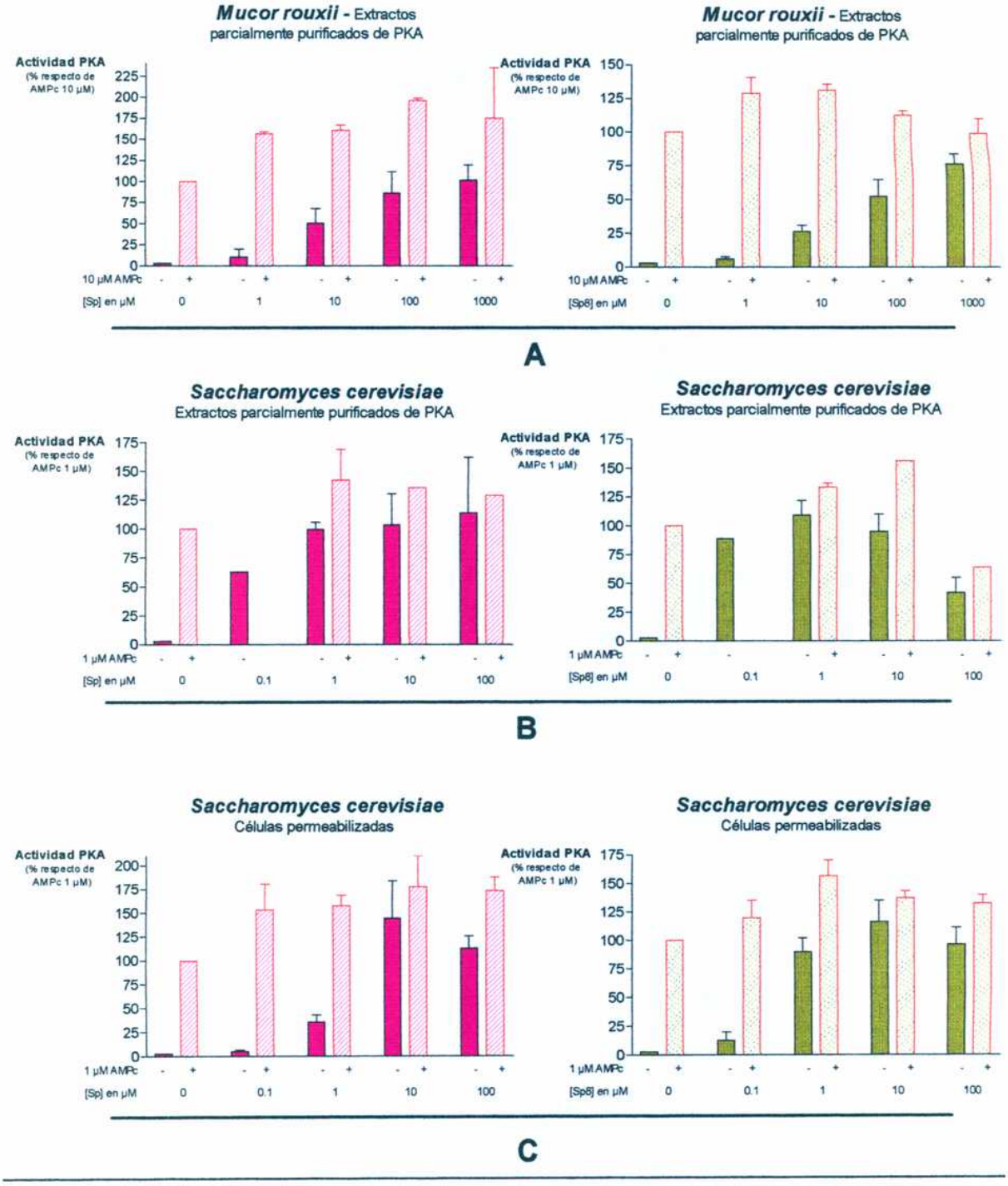
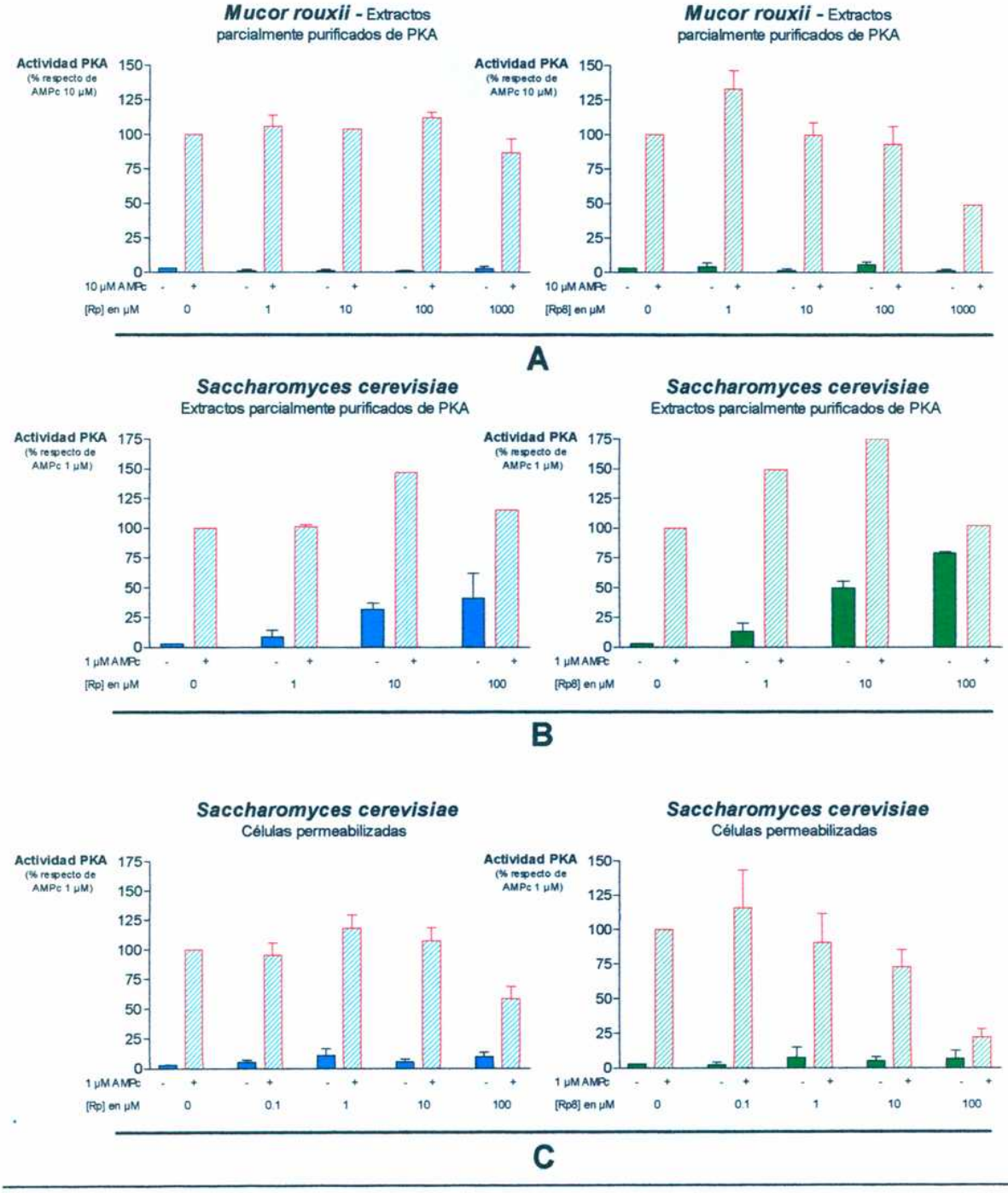


FIGURA 5: Ensayos de Activación de PKA en ausencia y presencia de AMPc. Análogos Rp y Rp8



LEVADURAS PERMEABILIZADAS COMO FUENTE DE ENZIMA

Posteriormente, con la intención de obtener una mayor activabilidad de PKA, se probó la utilización de células de *S. cerevisiae* sometidas a un protocolo de permeabilización (células permeabilizadas), descripto en Materiales y Métodos.

Dicho sistema nos permitió tener una apreciación más confiable del efecto de los análogos sobre la actividad de la PKA porque se logró que la enzima poseyera una gran dependencia del AMPc para su activación (usualmente obtuvimos en presencia de AMPc alrededor de 10 veces la actividad basal).

Se midió la actividad de la PKA de células permeabilizadas. Se ensayó el efecto de los análogos del AMPc solos (figura 3 C) o junto con AMPc 1 μM (figuras 4 C y 5 C). Se realizaron como mínimo tres experimentos independientes para cada análogo (cada una por duplicado). Es importante aclarar que en estos ensayos con células permeabilizadas todas las concentraciones a que se hace referencia son las logradas en el volumen final de incubación que no necesariamente coinciden con las obtenidas en el interior celular (ver Discusión). A partir de la figura 3 C se obtuvieron las $A_{0,5}$ ap. aproximadas que se muestran en la Tabla C (ver columna: células permeabilizadas).

Observando la figura 3 C y la tabla C se puede concluir que los Sp activan a la PKA en forma dosis dependiente, siendo más potente el Sp8 que logra una mayor activación a menores concentraciones. Este comportamiento es similar al mostrado con enzima proveniente de extractos parcialmente purificados. Los Rp no activan a la PKA.

Al actuar en presencia de AMPc, los Sp (figura 4 C) se comportan nuevamente como buenos agonistas, mientras que el comportamiento antagónico de los Rp (figura 5 C) es bastante pobre. El Rp recién presenta una mínima tendencia inhibitoria a altas concentraciones (100 veces de exceso respecto del AMPc) y el Rp8 presenta un comportamiento similar logrando una inhibición un poco mayor que el Rp.

La inhibición de la actividad de PKA observada a altas concentraciones de nucleótidos cíclicos en las figuras 3, 4 y 5 se debe a que los mismos compiten por el sitio de unión para el ATP en la subunidad C de la PKA. Si se elevan las concentraciones de ATP en los ensayos, se elimina el efecto inhibitorio de esas concentraciones de análogos (resultados no publicados del laboratorio, pero descriptos ya por otros investigadores (Woodford, T. *et al.*, 1989)).

Tabla C: Ensayos de medición de la actividad de la PKA. Efecto de los análogos en ausencia de AMPc. $A_{0,5}$ aparentes obtenidas a partir de los gráficos de la figura 3 (Valores aproximados)

	PREPARACIONES ENZIMÁTICAS		CÉLULAS PERMEABILIZADAS
	M. rouxii	*S. cerevisiae*	*S. cerevisiae*
AMPc	1.2 µM	< 0.1 µM	0.3 µM
Sp	10.2 µM	< 0.1 µM	1.3 µM
Sp8	53.7 µM	< 0.1 µM	0.3 µM
Rp	> 1 mM	>100 µM	>100 µM
Rp8	> 1 mM	9.6 µM	>100 µM

4) PUESTA A PUNTO DE LOS ENSAYOS *IN VIVO*

SUSTENTO TEÓRICO DE LOS DISEÑOS IDEADOS

Para caracterizar el comportamiento de los análogos *in vivo*, en primer lugar, es necesario enfocar un fenómeno que se sepa que ocurre como resultado de la activación o inhibición de la vía de transducción de señales por AMPc. Una vez elegido un fenómeno que cumpla con dicho requerimiento, es importante ajustar las condiciones en que se llevará a cabo la caracterización.

Krebs (Beavo, J. *et al*, 1974) y su grupo, demostraron que las concentraciones de PKA intracelulares, que son mucho mayores que las usadas en los ensayos *in vitro* (orden de concentraciones: µM vs. nM, respectivamente) conllevan un corrimiento hacia la derecha en las curvas de activación. En otras palabras, la concentración de AMPc necesaria para lograr un 50 % de la actividad máxima (EC_{50}) es mucho mayor en un sistema *in vivo* que en uno *in vitro*.

Tomando en cuenta lo antedicho, y el alto costo de los análogos, ideamos diseños que redujeran los volúmenes de incubación permitiendo alcanzar concentraciones del orden de mM, utilizando cantidades accesibles de los compuestos.

M. rouxii

Como mencionáramos en la Introducción, se sabe que la presencia sostenida de db-AMPc (Pereyra, E. *et al.*, 1992) o de análogos específicos de sitio 2 de la PKA, como son los sustituidos en N-6 (Pereyra, E. *et al.*, manuscrito en preparación), en cultivos de *M. rouxii* en medio definido con glucosa como fuente de carbono, impide la emisión del tubo germinativo sin afectar el crecimiento general, que se produce en forma isodiamétrica. Enfocándonos en este fenómeno, se plantearon dos diseños experimentales para observar la acción de los nuevos análogos. Los protocolos de ambos experimentos pueden verse en Materiales y Métodos (**1.1.2- B)**).

El primer diseño sólo difiere del ensayo habitual que se viene realizando en nuestro laboratorio en que se utiliza un volumen mucho menor (500 µl en lugar de 4 ml.). Se cultivan las esporas en medio definido, se agrega el análogo momentos antes de la emisión del tubo germinativo y se prosigue con la incubación. Suponiendo que la hipótesis presentada en la Introducción de la necesidad de un sustrato de PKA fosforilado para desencadenar la emisión hifal es correcta, se esperaría que tanto un buen agonista de PKA (al igual que ocurre con el N^6ben-AMPc) como un buen antagonista impidan la emisión del tubo germinativo. La explicación para ello sería que los agonistas conducen a una inhibición regulada de los niveles de C por aumento del cociente R/C, mientras que los antagonistas impiden la activación natural que podría sufrir la PKA por acción del AMPc endógeno. En ambos casos, no sería posible la fosforilación del presunto sustrato de PKA necesaria para dar la emisión hifal.

El segundo es un diseño novedoso en el que se planteó la administración de los análogos del AMPc previo a la emisión del tubo germinativo, y sólo por un breve intervalo de tiempo. Luego se lavan las drogas y se continúa la incubación en medio definido. De esta forma se intenta actuar exclusivamente sobre la actividad de la PKA, sin modificar sus niveles. Si es correcta la hipótesis de que la emisión del tubo germinativo es consecuencia de la activación de la PKA, esperamos observar un adelanto en el tiempo de emisión del tubo germinativo por el agregado de agonistas de PKA y como mínimo un retraso en el mismo (o mejor una inhibición total de la emisión hifal) si agregamos antagonistas.

Una ventaja práctica de ambos diseños es que como se realiza la administración de las drogas justo antes de la emisión del tubo germinativo, se

requieren menores concentraciones que cuando se lo hace al comenzar con la incubación de las esporas, (Pereyra, E., comunicación personal).

En ambos casos, el efecto de la estimulación / inhibición de la PKA sería evaluado observando si ocurre algún adelanto / retraso temporal en la emisión del tubo germinativo o algún otro tipo de modificación en la morfología del mismo.

Los ensayos realizados hasta el momento, siguiendo el primer diseño, fueron controles con análogos conocidos como el N^6ben-AMPc. Dichos controles fueron necesarios para corroborar que al cambiar las condiciones de ensayo, disminuyendo los volúmenes de incubación de 4 ml a 500 µl, lo que conlleva algunas diferencias técnicas respecto del ensayo habitual (como ser una superficie de intercambio de gases reducida y un menor número de células disponible en el momento de realizar las observaciones), se lograba obtener el efecto sobre la emisión. Los resultados obtenidos mostraron la no emisión del tubo germinativo, como era de esperarse.

Siguiendo el segundo diseño, con N^6-ben-AMPc como agonista conocido, se obtuvieron resultados preliminares que indican que se da un adelanto en la emisión del tubo germinativo, respecto del control sin droga. Este dato avalaría la hipótesis de la necesidad de un sustrato fosforilado de PKA para la emisión del tubo germinativo.

S. cerevisiae

En *S. cerevisiae* los niveles de AMPc aumentan como consecuencia de la activación de los productos de los genes *ras1* y *ras2*, que son efectores positivos de la AC (Field, J. *et al.*, 1987).

En este trabajo utilizamos dos mutantes de levaduras. Las primeras tienen interrumpido el gen *ras2* (*RAS2::LEU2*), no obstante lo cual son viables, aunque presentan severos defectos nutricionales (Tatchell, K. *et al.*, 1985; Thevelein, J. M., 1992). La otra mutante utilizada está afectada en el gen *bcy1* que codifica para la R de *S. cerevisiae*, más específicamente, en el dominio A de unión a AMPc (*bcy1-14)*. Esta mutación parece afectar la estructura tridimensional de R, de una manera similar a la que se da por la unión de AMPc, disminuyendo de este modo la afinidad de R por C (Zaremberg, V. & Moreno, S., 1996). Por consiguiente, presenta las características de una vía de RAS-AC hiperactiva.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas para estos ensayos poseen las siguientes características relevantes para nuestro diseño:

Cepa	Descripción	Observaciones	Tinción con I_2
ras2	interrupción del gen RAS2	hiperacumula glucógeno	*azul fuerte*
salvaje	genotipo salvaje	niveles normales de glucógeno	azul claro
bcy1-14	mutación en la subunidad R de la PKA	no acumula glucógeno	negativa

Para nuestros diseños experimentales aprovechamos el hecho de que la acumulación de glucógeno está regulada negativamente por la actividad de PKA y es sumamente fácil de medir mediante tinción con vapores de I_2. Nuevamente se ideó un método para alcanzar concentraciones finales de análogo del orden de mM, utilizando volúmenes pequeños de medio de cultivo (para mayor detalle, ver Materiales y Métodos sección **1.2.2-B)**).

Para estudiar el efecto *in vivo* de los análogos de AMPc en *S. cerevisiae* se analizarían los niveles de glucógeno presentes en distintas cepas de levaduras luego de la incubación con el análogo indicado.

Los ensayos realizados hasta el momento, fueron controles con N^6ben-AMPc que suele ser , generalmente, un buen agonista de las PKA. Como nunca se había probado el efecto de análogos del AMPc *in vivo* en la forma en que lo habíamos diseñado era necesario hacer este control.

RESULTADOS:

Tabla D

Cepa	Tinción con I_2	Tinción con I_2
	sin droga	**N^6-ben-AMPc**
ras2	+++	+
salvaje	+	+
bcy1-14	-	-

La tabla D muestra los resultados preliminares obtenidos. El agregado de N^6-ben-AMPc en el medio de cultivo de la cepa ras2 disminuyó los niveles de glucógeno

respecto del control sin droga, como era de esperarse al estimular la PKA. Al agregarlo a la cepa bcy1-14 que tiene de por sí alta actividad de PKA, la tinción, como se esperaba siguió siendo negativa. Sin embargo, en el caso de la cepa salvaje, el resultado obtenido no parece mostrar una mayor actividad de PKA respecto del control sin droga, dado que los niveles de glucógeno no se modificaron significativamente.

Una modificación que se podría implementar en este ensayo es la utilización de cepas que posean, además de los genotipos utilizados, una disrupción en el gen que codifica para la PDE2 (PDE de alta afinidad). Se sabe que estas mutantes realizan una mejor captación de AMPc del medio y, si esto sucediese también con los análogos que nosotros deseamos ensayar sería ciertamente ventajoso.

DISCUSIÓN

1) ENSAYOS DE COMPETENCIA POR LA HIDRÓLISIS DE [^{3}H]AMPc

Con el fin de estimar la estabilidad de los compuestos frente a la degradación por las PDEs en sistemas eucariontes inferiores, realizamos un estudio de competencia de la hidrólisis de [^{3}H]AMPc por las enzimas de alta afinidad de ambos organismos. A partir de los curvas ajustadas de la figura 1 se calcularon los IC_{50} aproximados para 2 µM de AMPc informados en la tabla A. Los mismos reflejan la interacción entre las respectivas PDEs y los compuestos utilizados, dando una idea preliminar respecto de su afinidad y su potencia como competidores. En términos generales, el IC_{50} puede ser una medida de la hidrólisis del análogo siempre y cuando el mecanismo de inhibición sea competitivo. Para obtener el valor aproximado de las K_i de los compuestos (parámetro cinético) a partir de los IC_{50} se utiliza la fórmula que los relaciona: $K_i = IC_{50}/(1+[S]/K_m)$, donde K_i es la constante de inhibición de ese compuesto, IC_{50} la concentración que provocó un 50 % de inhibición en las condiciones de ensayo, [S] la concentración de sustrato utilizada y K_m la constante de Michaelis-Menten para la enzima. Dicha fórmula es válida para los casos en que la inhibición es competitiva y la cinética es de tipo Michaelis-Menten. Como se desprende de la fórmula, los IC_{50} no son parámetros cinéticos y dependen de la concentración de sustrato utilizada en el ensayo. Para condiciones de ensayo en las cuales $[S] << K_m$, el IC_{50} se corresponde con la K_i para el análogo. Como en los ensayos realizados la [S] fue de 2 µM, mayor que las K_m de ambas enzimas, se utilizó la fórmula mencionada para estimar las K_i correspondientes.

Para la PDE de *M. rouxii* cuya K_m es de 0.9 µM, los valores de K_i obtenidos a partir de los IC_{50} aproximados que figuran en la tabla A fueron 1.1 µM para AMPc, 191.4 µM para Sp y >310 µM para el Sp8 y para ambos compuestos Rp. Se observa que la inhibición de la hidrólisis de [^{3}H]AMPc por los análogos es muy leve, con lo que podría inferirse que tampoco pueden competir por el sitio activo y por ende serían resistentes a la degradación. Conclusiones más finas requerirían el estudio detallado de la hidrólisis del análogo radiactivo (O'Neill, P. *et al.*, 1975) o la cromatografía (HPLC) del producto de la hidrólisis del compuesto sin marcar (Beebe *et al.*, 1988).

Para *S. cerevisiae*, todos los análogos compitieron en mayor o menor medida la hidrólisis de [^{3}H]AMPc; si se aplica la fórmula a los IC_{50} correspondientes de la tabla A, considerando una K_m de 170 nM para la PDE de alta afinidad, se obtienen valores aproximados para las K_i que nos dan una idea de la afinidad de la PDE por

los análogos. Los valores calculados fueron 114 nM para AMPc, 1.3 μM para Sp, 9.4 μM para Sp8, >78 μM para Rp y 3.6 μM para Rp8. Si bien nuestros resultados dejarían abierta la posibilidad de que los análogos, siendo capaces de competir puedan o no ser hidrolizados, trabajos hechos por Van Lookeren Campagne, M. *et al.* (1990) demostraron que los análogos Sp, Sp8 y Rp no son hidrolizados por la PDE de alta afinidad (PDE2) de *S. cerevisiae*. Estos investigadores obtuvieron los siguientes valores de K_i' aparentes: 1,2 μM para Sp, 0,3 μM para Sp8 y 190 μM para Rp mostrando que la PDE2 presenta mayor afinidad por Sp que por Rp, lo cual fue corroborado en este trabajo, como puede observarse en la tabla A. Sin embargo, a diferencia de sus resultados, nuestros ensayos revelaron mayor afinidad por Sp que por Sp8.

Trabajos realizados por Suoranta, K. & Londesborough, J. en 1985 demostraron que la afinidad de la PDE de bajo K_m de *S. cerevisiae* por los análogos Sp y Rp es altamente dependiente de la concentración de metales bivalentes. Para una concentración de Mg^{2+} de 1 mM, la inhibición de la hidrólisis de [^{3}H]AMPc por Sp fue mayor que la producida por Rp (como se viene describiendo), mientras que para una concentración de Zn^{2+} de 0,1 mM las afinidades resultaron similares. Tanto en el trabajo de Van Lookeren Campagne como en el nuestro la concentración de metales bivalentes utilizada fue elevada (5 y 10 mM, respectivamente).

Es muy importante destacar que los valores informados en las tablas A, B y C, provenientes de las curvas de las figuras 1, 2 y 3, respectivamente, tienen asociados errores estándar muy grandes, como puede observarse por las barras de SEM de cada media graficadas en todas las figuras. Por este motivo, en todas las tablas se recalca que los valores informados son aproximados.

2) ENSAYOS DE COMPETENCIA DE LA UNIÓN DE [^{3}H]AMPc A LA SUBUNIDAD R

Con el objeto de investigar si los análogos de tipo "S" son capaces de activar a la PKA y los de tipo "R" son capaces de inhibir su activación, se realizaron ensayos de competencia de la unión de [^{3}H]AMPc a R. Por tratarse de análogos estructurales del AMPc se supone que su acción se da en ambos casos por competencia por el sitio de unión de AMPc en R.

M. rouxii: todos los análogos compitieron la unión menos eficientemente que el propio AMPc, siendo el Sp el único buen competidor, mostrando un perfil similar al del

AMPc, aunque con menor afinidad. Tanto el Rp como los derivados 8-Br fueron pobres en la competencia. La subunidad R posee dos sitios de unión de AMPc y los análogos sustituidos en el C 8 son específicos del sitio B. Era de esperarse que dichos análogos compitieran sólo parcialmente por el [^{3}H]AMPc, como se observa en la figura 2 A, pues teniendo menor afinidad por el sitio A recién serían capaces de competir por el [^{3}H]AMPc unido a dicho sitio a mayores concentraciones. De todos modos, se ve claramente en la figura 2 A que incluso la afinidad de estos compuestos por su sitio específico es baja, comparada con la que presenta el AMPc, ya que requieren mucho mayor concentración que éste para comenzar a desplazar la marca.

S. cerevisiae: como puede observarse en la figura 2 B, en este sistema el Sp compite la unión del [^{3}H]AMPc con una afinidad levemente menor que el AMPc y el Rp sólo logra competir a concentraciones elevadas. En el caso del Rp8 se observa un comportamiento típico de los análogos con especificidad de sitio que consiste en una curva dosis - respuesta con una primera etapa de competencia de la marca a bajas concentraciones, una etapa a concentraciones intermedias en la cual no se observa mayor competencia y una etapa a concentraciones suficientemente altas donde logra contrarrestar la baja afinidad por el otro sitio y competir por la unión del [^{3}H]AMPc, eliminando la marca remanente. La figura 2 B sugiere que el Sp8 es sitio específico, compitiendo muy efectivamente a bajas concentraciones más de un 60 % de la marca, y con una pendiente más suave, la remanente. Éste último análogo resultó ser aun mejor que el AMPc en la competencia por su sitio de unión en R.

3) <u>ENSAYOS DE MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PKA</u>

Con idea de estimar el comportamiento de los análogos como activadores de las PKA y de observar si los compuestos "R" son capaces de impedir la activación lograda por un agonista realizamos los experimentos que se discuten a continuación.

Se ensayó la actividad de PKA obtenida de extractos purificados de *M. rouxii* y se encontró que los análogos Sp, ya sea solos (fig. 3 A) o con AMPc (fig. 4 A) son activadores de dicha enzima. Los Rp no activan a la PKA (fig. 3 A) pero, contrariamente a lo esperado, casi no logran antagonizar la activación de PKA por AMPc (fig. 5 A), como se ha descripto para la enzima de eucariontes superiores.

En *M. rouxii* se obtuvo una buena activabilidad de la enzima usando extractos purificados (usualmente hasta 10 veces de activación) por lo que confiamos en los

resultados obtenidos para el comportamiento de los análogos, en las condiciones de ensayo utilizadas.

Sin embargo, con extractos de PKA de *S. cerevisiae* no se logró una buena dependencia de AMPc para la activación de la enzima (no más de tres veces de activación). Se sabe que el IC_{50} para la inhibición de C por R de la PKA de *S. cerevisiae* es de 40 nM (Kuret, J. *et al.*, 1988) y dado que la concentración de enzima usada en los ensayos suele ser del orden de nM, la disociación y consecuente activación de la PKA se torna espontánea e independiente de AMPc en dicho sistema. Se sabe también que el K_d para R/C en eucariontes superiores es considerablemente menor que el IC_{50} de *S. cerevisiae* (Døskeland, S. O. *et al.*, 1993) por lo que en dichos organismos, tanto como en *M. rouxii* que tiene una alta afinidad entre R y C sí puede observarse la activación de PKA por AMPc para la holoenzima, en ensayos realizados en condiciones similares a las descriptas en este trabajo.

Ensayando la actividad de PKA obtenida de extractos purificados de *S. cerevisiae*, los análogos Sp fueron buenos activadores en ausencia (fig. 3 B) y presencia (fig. 4 B) de AMPc. Sin embargo, se encontró que los análogos Rp se comportaron como agonistas de la enzima tanto en ausencia (figura 3 B) como en presencia (figura 5 B) de AMPc. Posiblemente este comportamiento de los compuestos Rp haya sido favorecido por el hecho de que la disociación de la PKA de *S. cerevisiae* en estas condiciones es, como dijimos, más bien espontánea. Resultados similares para el Rp fueron observados en el hongo *Dictyostelium discoideum* en el trabajo llevado a cabo en 1984 por Van Haastert y otros investigadores.

Ya que era tan fácil la disociación espontánea de la PKA de *S. cerevisiae* en este tipo de ensayos, y con la intención de obtener una mayor activabilidad de PKA para así confiar en los resultados obtenidos para el comportamiento de los análogos, se probó medir la actividad de la enzima en células permeabilizadas. Los resultados obtenidos llevaron a conclusiones que en líneas generales son las mismas que las obtenidas para la PKA de *M. rouxii* (ver figuras 3, 4 y 5, paneles C). Las $A_{0,5}$ aparentes obtenidas en este sistema resultaron mayores que las obtenidas para los ensayos realizados con extractos purificados, lo que era esperable dado que las concentraciones de PKA intracelulares, por ser mucho mayores que las usadas en los ensayos *in vitro* (orden de concentraciones: µM vs. nM, respectivamente), conllevan un corrimiento hacia la derecha en las curvas de activación (Beavo, J. *et al*, 1974).

Para que los resultados fuesen comparables y para agrupar los datos obtenidos en distintos experimentos, estos se expresaron en las figuras 3, 4 y 5 como el % de activación de PKA por concentraciones crecientes de análogo respecto de la obtenida con una concentración fija de AMPc (tomada como valor de referencia, es decir como 100%) y no respecto de la "activación máxima" de PKA. Al graficar de esta manera, las $A_{0,5}$ no se corresponden con las concentraciones de análogo que dan el 50% de la actividad máxima obtenible para esa cantidad de enzima, y por eso las llamamos $A_{0,5}$ aparentes. En las condiciones en que se realizaban los ensayos no se logró la máxima activación de la PKA de *M. rouxii* dado que, entre otros factores que se explicarán más adelante, la activación por AMPc es muy dependiente de la concentración de enzima usada, mientras que la PKA de *S. cerevisiae* no presenta tanta dependencia con la concentración. Por otra parte, en ambos casos es sabido que altas concentraciones de nucleótidos cíclicos inhiben la actividad por competencia con el ATP por su sitio de unión en C, por esto se tomaron como referencia concentraciones bajas de AMPc (10 µM para *M. rouxii* y 1 µM para *S. cerevisiae*) que dieron buena activación de PKA sin mostrar inhibición y que permitieron maximizar la relación análogo/AMPc para ver mejor el efecto de los competidores.

A su vez, como se mencionó en Resultados, las $A_{0,5}$ aparentes obtenidas de las figuras 3, 4 y 5 no son consideradas como parámetros cinéticos de la PKA. Para entender por qué, es necesario adentrarse un poco en lo que sabemos sobre PKA de *M. rouxii* y su activación, y también puntualizar cuáles fueron las condiciones en que se realizaron los ensayos de medición de la actividad de PKA.

Cuando se quiere obtener el parámetro $A_{0,5}$ para un activador de una enzima alostérica clásica se realizan curvas de activación de dicha enzima eligiéndose una concentración fija de enzima, concentraciones saturantes de sustratos y observándose el efecto de concentraciones crecientes del activador. Si bien no podemos asimilar completamente a la PKA con una enzima alostérica, pues en éstas no hay disociación, utilizaremos esta comparación a los efectos de analizar el valor conceptual de las $A_{0,5}$ obtenidas.

Si se eligen dos concentraciones de enzima (la 1 y la 2 que corresponde al doble de la 1) en ambos casos coincide la $A_{0,5}$, siendo necesaria la misma concentración de activador para obtener el 50 % de la actividad máxima, la cual sí difiere según la concentración de enzima usada.

- Características conocidas de la activación de PKA de *M. rouxii*:

- R y C no se disocian por AMPc solo: varias evidencias indican que la interacción entre las subunidades R y C de la PKA fúngica es particularmente alta. Una de ellas es la falta de disociación por incubación con AMPc; en estas condiciones se ocupa *solo el* sitio B; sin embargo por agregado de ClNa, o policationes junto con el *AMPc* se puede producir disociación total de la holoenzima (Paveto *et al.* 1989, Guthmann *et al.* 1990, Moreno, S. & Passeron, S., 1980; Pastori *et al.*, 1981). La falta de linealidad de la actividad de PKA en presencia de AMPc con la concentración de enzima cuando se utilizan péptidos sintéticos como sustratos, en contraposición a lo que ocurre cuando se utilizan histona o protamina, es otra prueba de que la enzima no se disocia fácilmente (Guthmann *et al.* 1990, Zaremberg *et al.* manuscrito en preparación). El concepto de que la afinidad entre R y C en *M. rouxii* sea alta surge de comparar su comportamiento frente a las enzimas de mamíferos.

- La activación obtenida con distintos análogos del AMPc varía con la concentración de PKA: hemos encontrado que la activación de PKA por análogos sitio específicos es altamente dependiente de la concentración de enzima (Pereyra *et al.*, manuscrito en preparación).

- Condiciones en que se realizaban los ensayos de medición de la actividad de PKA:

- se cosechaba el micelio de *M. rouxii* a un tiempo en que la enzima estuviese fresca, no proteolizada, con una proporción de 2 R a 2 C (normal)

- condiciones lineales de ensayo (actividad enzimática proporcional con la cantidad de proteína, a una concentración de AMPc dada)

- se cuidaba que la enzima estuviese activable (no disociada, o sea que hubiese una alta dependencia de AMPc para obtener actividad)

- se utilizaba una concentración de enzima que permitiese ver cambios en el comportamiento de los análogos (es decir, que el sistema fuera sensible, habiendo cpm suficientes como para evidenciar tanto una inhibición como una activación de la PKA)

Dadas las características de activación de PKA mencionadas y las condiciones en que se realizaron los ensayos, las curvas de activación obtenidas en días separados difieren de las clásicas para una enzima alostérica, no llegándose a obtener valores reproducibles de $A_{0,5}$. Las razones para estas diferencias son varias:

- las condiciones de ensayo no aseguraron una activación máxima de PKA ya que con AMPc solo la PKA no se disocia completamente, sumado a la inhibición de la actividad aparente que se obtiene a altas concentraciones de nucleótido cíclico, por competencia con el ATP
- se utilizaron distintas concentraciones de enzima, lo cual hace diferentes a las curvas de activación (como se explicó más arriba) y puede conllevar un comportamiento diferente de los análogos sitio específicos.

Cabe comentar aquí la dificultad que existe para medir la cantidad de PKA de *M. rouxii* cuando se realiza un ensayo de rutina de medición de su actividad. Esto podría realizarse por ejemplo, ensayando previamente la actividad ligante de AMPc y verificando por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa que la cantidad de R medida se corresponde exactamente con la R asociada a holoenzima, para poder estimar la cantidad de holoenzima a partir del dato de actividad ligante. Sin embargo esto no sólo sería poco operativo sino que además, tiene la desventaja de que al transcurrir el tiempo (aunque se conserven las preparaciones a bajas temperaturas) la activabilidad de la PKA va disminuyendo, posiblemente por proteólisis.

Es importante recordar que nuestro objetivo no era describir la curva de activación de PKA por concentraciones crecientes de activadores ni obtener sus $A_{0,5}$, sino comparar el comportamiento de los análogos (es decir si son mejores o peores que el AMPc, en forma relativa) para lo cual era necesario disponer de un sistema sensible, como se explica en el último punto de las "Condiciones en que se realizaban los ensayos de medición de la actividad de PKA".

En la mayoría de los ensayos graficados en las figuras 3, 4 y 5 se tomaron resultados de experimentos que se hicieron en días separados (cada día un análogo distinto) y se graficaron juntos expresando los datos como valores relativos a la activación obtenida en cada ensayo por una concentración fija de AMPc. Como se mencionó previamente, confiamos en la validez de este tratamiento de los datos dado que al comparar las $A_{0,5}$ ap. obtenidas por los análogos en los experimentos hechos en días distintos respecto de las obtenidas en unos pocos experimentos representativos en que todos los análogos fueron ensayados en el mismo momento, se ve que son valores comparables (en cuanto a su magnitud) y que conservan el orden relativo de las $A_{0,5}$ ap.

En los ensayos con células permeabilizadas de *S. cerevisiae* no podemos asegurar que las concentraciones intracelulares coincidan con las del medio, dado que no sabemos cómo son utilizados los análogos por la maquinaria celular (hidrólisis, captación por proteínas, inactivación metabólica, exclusión del interior celular hacia compartimientos intracelulares o bien hacia el medio externo, concentración en el interior celular por captación de los compuestos del medio, etc.) y que, además, desconocemos si las membranas de las células permeabilizadas son o no totalmente permeables (si bien comprobamos que se tiñen de azul al agregarles el colorante Tripan-blue, a diferencia de las mismas levaduras no permeabilizadas que lo excluyen, no se puede asegurar que la membrana haya pasado a ser completamente no selectiva, permitiendo el libre intercambio de los análogos entre las células y el medio).

Al realizarse los ensayos de activación de PKA por los análogos en presencia de AMPc, como puede observarse en las figuras 4 y 5 de los Resultados, las concentraciones de AMPc elegidas fueron de 1 µM para *S. cerevisiae* y de 10 µM para *M. rouxii* ya que esas fueron las condiciones de mayor sensibilidad para ambos sistemas. En general, si se estimulaba la PKA de *M. rouxii* con AMPc a concentraciones menores que 1µM, la actividad que se obtenía era baja (pocas cpm) y no se podían notar bien los efectos de una competencia (por ejemplo de una inhibición). Se puede explicar, en parte, esta baja actividad de PKA por la alta afinidad R/C en *M. rouxii*. En cambio, *S. cerevisiae* es más sensible posiblemente debido a su baja afinidad R/C, con lo que se obtenían buenas cpm con bajas concentraciones de AMPc (1µM). Con esas concentraciones de AMPc se logró, en cada caso, maximizar la relación competidor/AMPc y ver mejor el efecto de los competidores.

4) PUESTA A PUNTO DE LOS ENSAYOS *IN VIVO*

SUSTENTO TEÓRICO DE LOS DISEÑOS IDEADOS

Como explicamos en resultados, en este trabajo se idearon diseños experimentales útiles para ensayar la acción de compuestos que actúen sobre la vía de transducción de señales por AMPc. Sin embargo, si bien se realizaron controles (con N^6ben-AMPc) para ensayar dichos diseños, no se probaron los análogos que pretendíamos caracterizar. Las razones explicadas seguidamente fueron suficientes como para justificar que no hiciéramos la inversión económica necesaria para

comprar nuevamente las drogas, ya que lo que disponíamos no era suficiente como para realizar los estudios *in vivo*. Según los resultados obtenidos en la caracterización de los análogos en sistemas *in vitro* los análogos Sp podrían ser usados como agonistas de las acciones del AMPc *in vivo*; sin embargo, existen otros análogos del AMPc que han sido caracterizados en nuestro laboratorio y que son mucho mejores que los que se describen en este trabajo. Como la idea era encontrar un par agonista/antagonista con la ventaja de tener características similares de lipofilicidad, estabilidad frente a la degradación por PDE, etc., la única razón para utilizar a los compuestos Sp habría sido que su correspondiente compuesto Rp hubiese dado un buen antagonismo. Dado que los análogos Rp resultaron malos antagonistas de la activación de PKA por AMPc, los análogos Sp carecen de interés incluso como agonistas de PKA en nuestros sistemas. Más aun, respecto del Sp8 puede acotarse que, en general, los análogos 8 son malos como agonistas de la PKA de *M. rouxii*, no habiéndose logrado obtener con ellos el efecto morfológico y siendo bastante pobres como agonistas de PKA *in vitro*. Respecto al uso de los análogos Rp *in vivo* tampoco hay buenas perspectivas. El Rp sólo inhibe parcialmente a concentraciones del orden de mM, y lo más probable es que este efecto se deba a la competencia con el ATP por su sitio en C. El Rp8 actúa como inhibidor parcial en los ensayos mostrados, pero hay que recalcar que éstos fueron hechos a concentraciones de AMPc fácilmente competibles y que al probarlos con concentraciones de AMPc mayores, como se sabe que se dan *in vivo*, el Rp8 no podía antagonizar efectivamente la activación de la PKA lograda por el AMPc (resultados no mostrados).

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos en los ensayos de competencia por la hidrólisis de [^{3}H]AMPc y las disertaciones hechas en la sección 1) de esta Discusión, aportan evidencias en favor de la hipótesis de la estabilidad de los análogos frente *a la* actividad hidrolítica de las PDEs de eucariontes inferiores.

En cuanto a la afinidad de los análogos por los sitios de unión en R, observando la figura 2 se ve que a grandes rasgos los análogos Rp son menos afines que los Sp y que el AMPc. Esto podría explicar, al menos en parte, su pobre efecto antagónico. Por el contrario, los análogos Sp presentan mayor afinidad por los sitios de R lo que es coherente con el hecho de que influyan sobre la actividad de PKA.
Como las condiciones de concentración de sales son diferentes entre los ensayos de unión y los de activación de PKA, buscándose la disociación de R y C en los primeros, pero no así en los segundos, no tiene sentido hacer comparaciones más finas respecto de las concentraciones con que se observan los efectos de los análogos en uno y otro ensayos.

De los resultados mostrados en la figura 3 y Tabla C para ilustrar el comportamiento propio de los análogos frente a la PKA, puede afirmarse que los Sp (Sp y Sp8) son agonistas de las enzimas de ambos organismos, obtenidas por cualquiera de los métodos aquí practicados.
Por su parte, los análogos Rp (Rp y Rp8) no activan *per se* a la quinasa, obtenida de purificaciones parciales de *M. rouxii* (gráfico 3 A), o bien de células permeabilizadas de *S. cerevisiae*. (gráfico 3 C). Dicha característica es consistente con su posible acción como antagonistas de la activación de PKA.

Los resultados mostrados en las figuras 4 y 5 nos permiten ver cómo actúan los análogos sobre la PKA cuando está presente, además de ellos, el agonista natural AMPc. De los gráficos de la figura 4 puede afirmarse que los Sp son agonistas de las PKA de ambos organismos. Es importante aclarar que la disminución en la actividad de PKA al utilizar los análogos a altas concentraciones (y más aun en presencia de AMPc) fue debida muy probablemente a la competencia de éstos por el sitio de unión para el ATP de la subunidad C de la PKA.

Por otra parte, se ve que el Rp en presencia de AMPc (figura 5 A y 5 C), sólo logra una leve tendencia inhibitoria a las mayores concentraciones en el caso de los ensayos realizados en células permeabilizadas, no habiéndose alcanzado el 50 % de

inhibición en el rango de concentraciones ensayado. Además, esta tendencia podría adjudicarse al efecto inhibitorio antes mencionado. También puede verse en las figuras 5 A y 5 C que el Rp8 se comporta como antagonista débil de las PKAs, siendo la inhibición más pronunciada en *S. cerevisiae*. Aquí, los IC_{50} obtenidos fueron de aproximadamente 1mM para *M. rouxii* y de 10 µM para *S. cerevisiae*.

Como se observa en la figura 2 y según lo explicado en el segundo punto de esta Discusión, el Rp8 muestra en nuestros sistemas una preferencia por el sitio 1 de la R, y ya que es bastante mal competidor, esa preferencia es muy neta en el rango de concentraciones utilizado. Si se observan las figura 5 B y 5 C con más detenimiento, se puede notar que en presencia de AMPc concentraciones bajas de Rp8 inhiben levemente más que concentraciones un poco mayores; luego vuelve a aumentar la inhibición. Este comportamiento se visualiza como una forma de "n" en el perfil de activación de las PKA. Este mismo patrón también se observó en varias ocasiones para el caso de PKA de *M. rouxii*. Dicho comportamiento podría explicarse suponiendo que a bajas concentraciones de Rp8, la holoenzima tendría AMPc en el sitio 2 y Rp8 en el 1 ("especie mixta"). Esta especie podría presentar menor actividad si la modificación en la conformación de la R que justifica que disminuya su afinidad por C (y por lo tanto su disociación) fuera menor o distinta; o bien, suponiendo posible el modelo que postula que la holoenzima sin disociarse puede ser activa, no sería extraño que la activación lograda por la "especie mixta" fuese distinta que la que presenta en ambos sitios AMPc o Rp8.

Finalmente, haciendo referencia a las hipótesis planteadas en la Introducción, e interpretando los resultados obtenidos en esta investigación,

- se acepta la hipótesis de que ninguno de los compuestos es degradado por las PDEs de los eucariontes inferiores utilizados en este estudio
- se acepta la hipótesis de que los análogos Sp son agonistas de las PKAs de ambos organismos eucariontes inferiores
- se rechaza la hipótesis de que los análogos Rp son buenos antagonistas de las PKAs de ambos organismos eucariontes inferiores

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adashi, E. Y., Resnick, C. E. & Jastorff, B. (1990) Blockade of granulosa cell differentiation by an antagonistic analog of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP): central but non-exclusive intermediary role of cAMP in follicle-stimulating hormone action. *Mol. Cell. Endocrinol.* 72(1), 1-11.

Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. & Blackwell, M. (1996) Introductory Mycology. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Appleman, M. M., Thompson, W. J. & Russell, T. R. (1973) Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Adv. Cyclic Nucl. Res.* 3, 65-98.

Barber, R. & Butcher, R. W. (1983) The egress of Cyclic AMP from Metazoan Cells. *Adv. Cyclic Nucl. Res.* 15, 119-138.

Bartnicki-García, S. & Nickerson, W. J. (1962) Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii. J. Bacteriol.* 84, 841-858.

Beavo, J.A., Bechtel, P. J. & Krebs, G. (1974) Activation of Protein Kinase by Physiological Concentrations of Cyclic AMP. *PNAS* 71, 3580 - 3583.

Beavo, J. A., Hansen, R. S., Harrison, S. A., Hurwitz, R. L., Martins, T. J. & Mumby, M. C. (1982) Identification and properties of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol. Cell. Endocrinol.* 28(3), 387-410.

Beavo, J. A. (1995) Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol. Rev.* 75, 725-748.

Beebe, S. J., Beasley-Leach, A. & Corbin, J. D. (1988) cAMP analogs used to study low-Km, hormone-sensitive phosphodiesterase. *Methods Enzymol.* 159, 531-540. 531-540.

Bianchini, G. M., Pastini, A. C., Muschietti, J. P., Tellez-Inon, M. T., Martinetto, H. E., Torres, H. N. & Flawia, M. M. (1990) Adenylate cyclase activity in cyanobacteria: activation by Ca(2+)-calmodulin and a calmodulin-like activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1055(1), 75-81.

Botsford, J. L. (1981) Cyclic nucleotides in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 45(4), 620-642.

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

Braumann, T., Erneux, C., Petridis, G., Stohrer, W. D. & Jastorff, B. (1986) Hydrolysis of cyclic nucleotides by a purified cGMP-stimulated phosphodiesterase: structural requirements for hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 871(2), 199-206.

Bruno, K. S., Aramayo, R., Minke, P. F., Metzenberg, R. L. & Plamann, M. (1996) *Loss* of growth polarity and mislocalization of septa in a Neurospora mutant altered in the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J.* 15(21), 5772-5782.

Büchler, W., Walter, U., Jastorff, B. & Lohmann, S. M. (1988) Catalytic Subunit of cAMP - Dependent Protein Kinase is Essential for cAMP - Mediated Mammalian Gene Expression. *FEBS Lett.* 228, 27-32.

Cannon, J. F., Gibbs, J. B. & Tatchell, K. (1986) Suppressors of the *ras2* mutation of *Saccharomyces cerevisiae. Genetics* 113, 247-264.

Cannon, J. F., Gitan, R. & Tatchell, K. (1990) Yeast cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit mutations display a variety of phenotypes. *J. Biol. Chem.* 265, 11897-11904.

Cantore, M. L. & Passeron, S. (1982) Kinetic properties, solubilization, and molecular characterization of Mucor rouxii adenylate cyclase. *Arch. Biochem. Biophys.* 219,1-11.

Carricarte, V. C., Bianchini, G. M., Muschietti, J. P., Tellez-Inon, M. T., Perticari, A., Torres, N. & Flawia, M. M. (1988) Adenylate cyclase activity in a higher plant, alfalfa (*Medicago sativa*). *Biochem. J.* 249(3), 807-811.

Coso, O. (1993), Tesis Doctoral FCEyN, UBA.

Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T. & Hidaka, H. (1990) Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 265(9), 5267-5272.

de Oliveira, J. C., Borges, A. C., Marques, M. do V. & Gomes, S. L. (1994) Cloning and characterization of the gene for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii. Eur. J. Biochem.* 219(1-2), 555-562.

Døskeland, S. O., Maronde, E. & Gjertsen, B. T. (1993) The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase: functionally different or redundant? *Biochem. Biophys. Acta* 1178, 249-258.

Dostman, W. (1987) *Methoden zur Synthese von Adenosin-3' 5' -cyclothiophosphat (cAMPS) und Ausgewählter Derivate: Chemische und Biologische Eigenschaften*. Ph. D. thesis, University of Bremen, Federal Republic of Germany.

Durrenberger, F., Wong, K. & Kronstad, J. W. (1998) Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in Ustilago maydis. *PNAS* 95(10), 5684-5689.

Eckstein, F. (1985) Nucleoside phosphorothioates. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 367-402.

Field, J., Broek, D., Kataoka, T. & Wigler, M. (1987) Guanine nucleotide activation of, and competition between, RAS proteins from Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 7(6), 2128-2133.

Flawia, M. M. & Torres, H. N. (1972a) Adenylate cyclase activity in *Neurospora crassa*. I. General properties. *J. Biol. Chem.* 247(21), 6873-6879.

Flawia, M. M. & Torres, H. N. (1972b) Adenylate cyclase activity in *Neurospora crassa*. II. Kinetics. *J. Biol. Chem.* 247(21), 6880-6883.

Francis, S. H. & Corbin, J. D. (1994) Structure and function of Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinases. *Ann. Rev. Physiol.* 56, 237-272.

Galvagno, M. A., Moreno, S., Cantore, M. L. & Passeron, S. (1979) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase from Mucor rouxii: regulation of enzyme activity by phosphorylation and dephosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 89(3), 779-785.

Genieser, H. -G., Dostmann, W., Bottin, U., Butt, E., & Jastorff, B. (1988) *Tetrahedron Letts.* 29, 2803-2804.

Gilman, A. G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* 56, 615-649.

Glass, D., Feller, M., Levin, L. & Walsh, D. (1992) Structural Basis for the Low Affinities of Yeast cAMP-Dependent and Mamalian cGMP-Dependent Protein Kinases for Protein Kinase Inhibitor Peptides. *Biochemistry* 31, 1728-1734.

Glikin, G. C., Judewicz, N. D. & Torres, H. N. (1982) Protein kinase activities in *Neurospora crassa*. Molecular properties. *Mol. Cell. Biochem.* 46(2), 121-126.

Gold, S., Duncan, G., Barrett, K. & Kronstad, J. (1994) cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev.* 8(23), 2805-2816.

Gross, R. E., Bagchi, S., Lu, X. & Rubin, C. S. (1990) Cloning, characterization, and expression of the gene for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Caenorhabditis elegans*. Identification of highly conserved and unique isoforms generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 265(12), 6896-6907.

Gross, J. D. (1994) Developmental decisions in Dictyostelium discoideum. *Microbiol. Rev.* 58, 330-351.

Guthmann, M., Pastori, R. & Moreno, S. (1990) Polyamines and basic proteins stimulate activation by cAMP and catalytic activity of Mucor rouxii cAMP-dependent protein kinase. *Cell Signal.* 2(4), 395-402.

Haidle, C.W. & Storck, R. (1966) Control of dimorphism in *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol.* 92, 1236 - 1244.

Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241(4861), 42-52.

Hockberger, P. E. & Swandulla, D. (1987) Direct ion channel gating: a new function for intracellular messengers. *Cell. Mol. Neurobiol.* 7(3), 229-236.

Hochstrasser, M. & Nelson, D. L. (1989) Cyclic AMP-dependent protein kinase in *Paramecium tetraurelia*. Its purification and the production of monoclonal antibodies against both subunits. *J. Biol. Chem.* 264(24), 14510-14518.

Houge, G., Vintermyr, O. K. & Døskeland, S. O. (1990) The expression of cAMP-dependent protein kinase subunits in primary rat hepatocyte cultures. Cyclic AMP down-regulates its own effector system by decreasing the amount of catalytic subunit and increasing the mRNAs for the inhibitory (R) subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Endocrinol.* 4(3), 481-488.

Hunter, T. (1995) Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorilation and Signaling *Cell* 80, 225-236.

Irie, K., Tokuda, H., Hagiwara, N., Koshimizu, K., Hayashi, H., Murao, S. & Ito, Y. (1985) Structure-activity relationship in the induction of Epstein-Barr virus by teleocidin derivatives. *Int. J. Cancer* 36(4), 485-488.

Jastorff, B. & Krebs, T. (1972) Analogues of adenosine 3',5'-cyclic phosphate containing nitrogen and sulphur in the phosphate ring. *Chem. Ber.* 105(10), 3192-3202.

Kataoka, T., Broek, D. & Wigler, M. (1985) DNA sequence and characterization of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell* 43(2 Pt 1), 493-505.

Kerner, N. & Passeron, S. (1984) Cyclic AMP-dependent protein kinase from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biochem.* 60(2), 115-122.

Kerner, N., Moreno, S. & Passeron, S. (1984) Regulation of cyclic AMP phosphodiesterase from *Mucor rouxii* by phosphorylation and proteolysis. Interrelationship of the activatable and insensitive forms of the enzyme. *Biochem. J.* 219, 293-299.

Khachatrian, L., Howlett, A. & Klein, C. (1987) Ammonium sulfate modifies adenylate cyclase and the chemotactic receptor of *Dictyostelium discoideum*. Evidence for a G protein effect. *J. Biol. Chem.* 262(17), 8071-8076.

Kim, J. Y., Haastert, P. V. & Devreotes, P. N. (1996) Social senses: G-protein-coupled receptor signaling pathways in Dictyostelium discoideum. *Chem. Biol.* 3, 239-243.

Krebs, E. G. (1993) Protein Phosphorylation and Cellular Regulation I (Nobel Lecture) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32, 1122-1129.

Kuret, J., Jhonson, K., Nicolette, C. & Zoller, M. J. (1988) Mutagenesis of the regulatory subunit of yeast cyclic AMP- dependent protein kinase; isolation of site directed mutants with altered binding affinity for catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* 263, 9149-9154.

Ladant, D. (1988) Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. *J. Biol. Chem.*263(6), 2612-2618.

Londesborough, J. & Suoranta, K. (1988) Zinc-containing cyclic nucleotide phosphodiesterases from bakers' yeast. *Methods Enzymol.* 159, 777-785.

Lowry, O. H., Roseborough, N. J., Farr, A. & Randall, R. (1951) Protein measurement withe the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275.

Lu, X. Y., Gross, R. E., Bagchi, S. & Rubin, C. S. (1990) Cloning, structure, and expression of the gene for a novel regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 265(6), 3293-3303.

Maia, J. C. & Camargo, E. P. (1974) c-AMP phosphodiesterase activity during growth and differentiation in *Blastocladiella emersonii*. *Cell. Differ.* 3(3), 147-155.

Marques, M. do V. & Gomes, S. L. (1992) Cloning and structural analysis of the gene for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Blastocladiella emersonii*. *J. Biol. Chem.* 267(24), 17201-17207.

McKnight, G. S. (1991) Cyclic AMP second messenger systems. *Current Op. Cell Biol.* 3, 213-217.

Moreno, S. & Passeron, S. (1980) Further studies on cyclic adenosine 3':5'-monophosphate protein kinase from dimorphic fungus Mucor rouxii. *Arch. Biochem. Biophys.* 199(2), 321-330.

Moreno, S., Galvagno, M. A. & Passeron, S. (1982) Control of *Mucor rouxii* adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase by phosphorylation-dephosphorylation and proteolysis. *Arch. Biochem. Biophys.*. 214(2), 573-580.

Moreno, S, Pastori, R & Passeron, S. (1983) Protein kinase of *Mucor rouxii.* Unshielding of new cyclic AMP-binding sites upon dissociation of the ternary complex holoenzyme-cyclic AMP. *Mol. Cell. Biochem.* 52, 13-16.

Müller, G., & Bandlow, W. (1991) A cAMP-binding ectoprotein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. Biochemistry* 30, 10181-10190.

Mutzel, R., Lacombe, M. L., Simon, M. N., de Gunzburg, J. & Veron, M. (1987) Cloning and cDNA sequence of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from *Dictyostelium discoideum. PNAS* 84(1), 6-10.

Nikawa, J., Sass, P. & Wigler, M. (1987) Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol.* 7(10), 3629-3636.

O' Neill, J. P., Schröder, C. H. & Hsie, A. W. (1975) Hydrolysis of Butiril Derivatives of Adenosine Cyclic 3':5'-Monophosphate by Chinese Hamseter Ovary Cell Extracts and Characterization of the Products. *J. Biol. Chem.* 250, 990-995.

Orlowski, M. (1991) Mucor dimorphism. *Microbiol. Rev.* 55(2), 234-258.

Pall, M. L. (1981) Adenosine 3',5'-phosphate in fungi. *Microbiol. Rev.* 45(3), 462-480.

Pastori, R. L., Kerner, N., Moreno, S. & Passeron, S. (1981) cAMP-dependent protein kinase from Mucor rouxii: physical evidence of a ternary complex holoenzyme-cAMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101(2), 663-671.

Pastori, R., Moreno, S. & Passeron, S. (1985) Polymeric structure of the cyclic AMP-dependent protein kinase from the dimorphic fungus *Mucor rouxii* and purification of its catalytic subunit. *Mol. Cell. Biochem.* 69(1), 55-66.

Paveto, C., Passeron. S., Corbin, J. D. & Moreno, S. (1989) Two different intrachain cAMP sites in the cAMP-dependent protein kinase of the dimorphic fungus *Mucor rouxii. Eur. J Biochem.* 179(2), 429-434.

Pereyra, E., Zaremberg, V. & Moreno, S. (1992) Effect of Dibutyryl-cAMP on Growth and Morphology of Germinating *Mucor rouxii* Sporangiospores. *Experimental Mycology* 16, 93 -101.

Robison, G. A. & Sutherland, E.W. (1971) Cyclic AMP and the function of eukaryotic cells: an introduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 185, 5-9.

Rosenberg, P. A. (1992) Functional Significance of Cyclic AMP Secretion in Cerebral Cortex. *Brain Res. Bull.* 29, 315-318.

Roskoski, R. (1983) Assay of protein kinase. *Methods Enzymol.* 99, 3-6.

Rossi, S., & Moreno, S. (1994) Regulation of protein kinase A subunits during germination of *Mucor rouxii* sporangiospores. *Eur. J. Biochem.* 222, 501-506.

Rossi, S. (1995), Tesis Doctoral FCEyN, UBA.

Rothermel, J. D., Stec, W. J., Baraniak, J., Jastorff, B. & Botelho, L. H. (1983) Inhibition of glycogenolysis in isolated rat hepatocytes by the Rp diastereomer of adenosine cyclic 3',5'-phosphorothioate. *J. Biol. Chem.* 258(20), 12125-12128.

Sass, P., Field, J., Nikawa, J., Toda, T. & Wigler, M. (1986) Cloning and characterization of the high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 83(24), 9303-9307.

Schaap, P., Soede, R. D. M., Van Ments-Cohen, M., Brandt, R., Firtel, R. A., Dostmann, W., Genieser, H.-G., Jastorff, B. & Van Haastert, P. J. M. (1993) Cell - permeable Non - hidrolizable cAMP Derivatives as Tools for Analysis of Signaling Pathways Controlling Gene Regulation in Dictyostelium. *J. Biol. Chem.* 268, 6323-6331.

Scott, J. D. (1997) Dissection of protein kinase and phosphatase targeting interactions. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 52, 227-239.

Shabb, J. B. & Corbin, J. D. (1992) Cyclic nucleotide-binding domains in proteins having diverse functions. *J. Biol. Chem.* 267(9), 5723-5726.

Sherman, F, Fink, G. & Hicks, J. B. (1981) Methods in yeast genetics: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY.

Shimoyama, M. M., Kawai, M., Tanigawa, Y. & Vedo, I. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 59-65.

Silberstein, S., Cantore, M. L., Galvagno, M. A. & Passeron, S. (1990) Isolation and characterization of a dimeric cAMP-dependent protein kinase from the fungus *Saccobolus platensis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 282(1), 132-140.

Suoranta, K. & Londesborough, J. (1985) The specificity of yeast low-K_m cyclic AMP phosphodiesterase towards free bivalent metal ions and the diastereisomers of cyclic adenosine phosphorothioate. *Biochem. J.* 226, 897-900.

Tang, W. J. & Gilman, A. G. (1992) Adenylyl cyclases. *Cell* 70(6), 869-872.

Tao, M. & Lipmann, F. (1969) Isolation of adenyl cyclase from *Escherichia coli. PNAS* 63(1), 86-92.

Tasken, K., Skalhegg, B. S., Tasken, K. A., Solberg, R., Knutsen, H. K., Levy, F. O., Sandberg, M., Orstavik, S., Larsen, T., Johansen, A. K., Vang, T., Schrader, H. P., Reinton, N. T., Torgenrsen, K. M., Hansson, V. & Jahnsen, T. (1997) Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv. Snd. Mess. Phosphoprot. Res.* 31, 191-204.

Tatchell, K., Robinson, L. C. & Breitenbach, M. (1985) RAS2 of Saccharomyces cerevisiae is required for gluconeogenic growth and proper response to nutrient limitation. *PNAS* 82(11), 3785-3789.

Taussig, R. & Gilman, A.G. (1995) Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J. Biol. Chem.* 270, 1 - 4.

Taylor, S. S. & Radzio-Andzelm, E. (1994) Cyclic AMP-dependent protein kinase. Capítulo 1 del libro: Protein Kinases. Ed. James Woodgett, IRL PRESS, Oxford University Press, N. Y.

Thevelein, J. M. (1992) The RAS-adenylate cyclase pathway and cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae. Antoine van Leeuwenhoek* 62, 109-130.

Thevelein, J. M. (1994) Signal Transduction in Yeast. *Yeast* 10, 1753-1790.

Thompson, W.J., Brooker, G. & Appleman, M. M. (1974) Assay of cicilic nucleotide phosphodiesterase with radioactive substrates. *Methods Enzymol.* 38, 205-217.

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E. G. & Wigler, M. (1987a) Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol.* 7(4), 1371-1377.

Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. & Wigler, M. (1987b) Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50(2), 277-287.

Tomes, C. (1991), Tesis Doctoral FCEyN, UBA.

Torruella, M., Flawia, M. M., Eisenschlos, C., Molina y Vedia, L., Rubinstein, C. P. & Torres, H. N. (1986) *Trypanosoma cruzi* adenylate cyclase activity. Purification and characterization. *Biochem. J.* 234(1), 145-150.

Ulloa, R. (1988), Tesis Doctoral FCEyN, UBA.

Ulloa, R. M., Mesri, E., Esteva, M., Torres, H. N. & Tellez-Inon, M. T. (1988) Cyclic AMP-dependent protein kinase activity in *Trypanosoma cruzi. Biochem. J. 255(1)*, 319-326.

Uno, I., Matsumoto, K. & Ishikawa, T. (1983) Characterization of a cyclic nucleotide phosphodiesterase-deficient mutant in yeast. *J. Biol. Chem.* 258(6), 3539-3542.

Van Haastert, P. J., Dijkgraaf, P. A., Konijn, T. M., Abbad, E. G., Petridis, G. & Jastorff, B. (1983) Substrate specificity of cyclic nucleotide phosphodiesterase from beef heart and from Dictyostelium discoideum. *Eur. J. Biochem.* 131(3), 659-666.

Van Haastert, P. J. M., Van Driel, R., Jastorff, B., Baraniak, J., Stec, W. J. & De Wit, R.J.W. (1984) Competitive cAMP Antagonists for cAMP-Receptor Proteins. *J. Biol. Chem.*, 259, 10020-10024.

Van Haastert, P. J. M., Kesbeke, F., Konijn, T. M., Baraniak, J., Stec, W. & Jastorff, B. (1987) (Rp)-cAMPS, an Antagonist of cAMP in Dictyostelium discoideum. *Bioact. Mol.* 3, 469-483.

Van Lookeren Campagne, M. M., Villalba Diaz, F., Jastorff, B., Winkler, E., Genieser, H.-G. & Kessin, R.H. (1990) Characterization of the Yeast Low Km cAMP-Phosphodiesterase With cAMP Analogues. *J. Biol. Chem.* 265, 5847-5854.

Walsh, D. A., Angelos, K. L., Van Patten, S. M., Glass, D. B. & Garetto, L. P. (1990) The inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase. *Peptides and protein phosphorylation* (ed. B. E. Kemp), p. 43 . CRC Press, Boca Raton.

Walsh, D. A. & Van Patten, S. M. (1994) Multiple pathway signal transduction by the cAMP-dependent protein kinase. *FASEB J.* 8, 1227-1236.

Woodford, T. A., Correll, L. A., McKnight, G. S. & Corbin, J. D. (1989) Expression and characterization of mutant forms of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. The effect of defective cAMP binding on holoenzyme activation. *J. Biol. Chem.* 264(22), 13321-13328.

Yarden, O., Plamann, M., Ebbole, D. J. & Yanofsky, C. (1992) cot-1, a gene required for hyphal elongation in Neurospora rassa, encodes a protein kinase. *EMBO J.* 11(6), 2159-2166.

Zaremberg, V. & Moreno, S. (1996) Analysis of the activation of cAMP-dependent protein kinase through the study of mutants or the yeast regulatory subunit. *Eur. J. Biochem.* 237, 136-142.

Zelada, A., Passeron, S., Lopes Gomes, S., Cantore, M. L. (1998) Isolation and characterisation of cAMP-dependent protein kinase from Candida albicans. Purification of the regulatory and catalytic subunits. *Eur. J. Biochem.* 252(2), 245-252.