

Tesis de Posgrado

Quinasa de proteínas dependiente de cAMP durante la germinación del hongo dimórfico *Mucor rouxii*

Rossi, Silvia Graciela

1995

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría 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 doctoral 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:

Rossi, Silvia Graciela. (1995). Quinasa de proteínas dependiente de cAMP durante la germinación del hongo dimórfico *Mucor rouxii*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2797_Rossi.pdf

Cita tipo Chicago:

Rossi, Silvia Graciela. "Quinasa de proteínas dependiente de cAMP durante la germinación del hongo dimórfico *Mucor rouxii*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2797_Rossi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis:

**Quinasa de proteínas dependiente de cAMP
durante la germinación del hongo dimórfico
Mucor rouxii.**

Autor:

Silvia G. Rossi

Directora de Tesis:

Dra. Silvia M. Moreno de Colonna

Lugar de trabajo:

Departamento de Química Biológica

Tesis presentada para optar al título de:

Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

№ 2

h. 2

A Femi y a nuestra hija Manuela.

A Julia y Alfredo

A Mariela

AGRADECIMIENTOS

A Silvia, por todo el entusiasmo, empuje y optimismo brindados. Por enseñarme a trabajar, pensar y crecer como investigadora, permitiendome discutir (y mucho), planear y hacer cada experimento con la supervisión criteriosa de sus ojos azules. Fuera de lo académico, por supuesto, por su gran apoyo, paciencia (inacabable), compañía y cariño de estos años.

A Elbis y Vani, por todo el compañerismo, discusiones, comprensión y cariño que me han brindado. Por la palabra y consejo, criteriosos y justos de Elbis y dulces y generosos de Vani, en el momento preciso.

A las tres, por sostenerme en mis tropiezos, alentarme y finalmente compartir la felicidad de tener a Manuela.

A las tres, por mas años de laboratorio que vendrán.

A Clau, por acompañarme siempre aún a la distancia.

INDICE

Introducción	1
Quinasas de proteínas	9
Quinasa de proteínas dependiente de cAMP	12
Subunidad Catalítica	13
Estructura de la subunidad catalítica	14
1-Sitio de unión de ATP	16
2-Sitio de unión del sustrato y actividad fosfotransferasa	18
Modificaciones post-traduccionales de la subunidad catalítica	21
Subunidad Regulatoria	22
Estructura de dominios de la subunidad regulatoria	22
1-Dimerización de la subunidad R	23
Localización subcelular	25
2-Inhibición de la subunidad catalítica	26
3-Unión de cAMP	27
Activación y reasociación de la holoenzima	29
Especificidad de sustrato de la PKA	31
Control de la síntesis y de la degradación de la subunidades de PKA	37
Quinasa de proteínas dependiente de cAMP de <i>Mucor rouxii</i>	39
Diferenciación en hongos - control por cAMP	40
Dimorfismo en <i>Mucor rouxii</i> .	42

Objetivo	47
Materiales y metodos	48
1- Preparación del material biológico	49
1.1- Organismo utilizado	49
1.2- Obtención de esporas y mantenimiento de la cepa	49
1.3- Cultivos	49
1.3.1- Preparación de cultivos para la purificación parcial de PKA	49
1.3.2- Preparación de cultivos para la medición de actividad enzimática durante la germinación	50
2- Preparaciones de PKA	51
2.1- Preparación de holoenzima	51
2.2- Preparación de las subunidades de la enzima	52
2.2.1- Preparación de subunidad catalítica	52
2.2.2- Preparación de subunidad regulatoria	53
3- Preparación de extractos de células de distintos tiempos de germinación	53
4- Ensayos de actividad de PKA	54
4.1- Medición de actividad de holoenzima parcialmente purificada	54
4.2- Medición de actividad de las subunidades de PKA en extractos crudos.	55
4.2.1- Determinación de subunidad regulatoria	55
4.2.2- Medición de subunidad catalítica	55

4.3- Medición de actividad de las subunidades de PKA	
en células permeadas	56
4.3.1- Preparación de células permeadas	56
4.3.2- Ensayos de actividad de C y R	57
5- Ensayos de autofosforilación	57
5.1- Autofosforilación de subunidad R	57
5.1.1- Cromatografía en cAMP-agarosa	58
6.- Centrifugación en gradientes de sacarosa	58
7- Determinación del contenido de cAMP	59
8- Ensayos para determinar sustratos endógenos	60
8.1- Preparación de muestras para western-blot	
revelado con anti-fosfoserina	60
8.2- Fosforilación de sustratos endógenos	61
8.2.1- Fosforilación en extractos libres de células utilizando	
subunidad C	61
8.2.2- Fosforilación en esporas permeadas	61
9- Métodos inmunológicos	62
9.1- Preparación de anticuerpos policlonales contra subunidad R	62
9.2- Determinación de la especificidad del anticuerpo	62
9.3- Western-blot	63
9.3.1- Transferencia	63
9.3.2- Revelado	63
a) Tinción para proteínas	63

b) Revelado con anticuerpos	64
10- Electroforesis en geles de poliacrilamida	64
11- Otras actividades enzimáticas	65
11.1- Peroxidasa y Catalasa	65
12- Medición de la concentración de proteínas	65
13- Medición de la radioactividad	66
13.1- Radiación β	66
13.2- Radiación γ	66
14- Buffers y Soluciones	66
Resultados	68
1- Regulación de la PKA durante la germinación	69
1.1- Actividad específica y concentración de las subunidades de la PKA durante la germinación	71
1.2- Concentración de cAMP durante la germinación	80
1.3- Análisis de extractos de cultivos obtenidos a lo largo de la germinación en gradientes de sacarosa	82
1.3.1- Extractos de esporas	82
1.3.2- Extractos de los distintos tiempos de germinación	91
2- Actividad en células permeadas	96
3- Análisis de sustratos endógenos de PKA en etapas tempranas de la germinación de <i>M. rouxii</i>	100
3.1- Autofosforilación de PKA de <i>M. rouxii</i>	101
3.1.1- Correlación entre proteínas fosforiladas y actividad de PKA	101

3.1.2.- Linearidad y dependencia con la temperatura de la reacción de autofosforilación	104
3.1.3- Elución específica de fosfoproteínas de cAMP-agarosa	107
3.1.4- Fosforilación de subunidad R purificada	111
3.1.5.- Integración de resultados	114
3.2- Influencia de la fosforilación de la holoenzima sobre su activación y disociación	115
3.3- Preparación de anticuerpos específicos contra la subunidad regulatoria	121
3.4- Análisis de sustratos endógenos en etapas tempranas de la germinación	126
3.4.1- Fosforilación de proteínas "in vivo" revelada con anticuerpos anti-fosfoserina.	128
3.4.2- Uso de anticuerpos anti-R	132
3.4.3- Fosforilación en esporas permeadas	138
3.4.4- Fosforilaciones con subunidad C exógena	141
3.5- Integración de resultados	143
Conclusiones	146
Bibliografía	148

INTRODUCCION

La célula reconoce señales en su entorno y responde adecuadamente a ellas; estos procesos de estímulo-respuesta se producen a través de cascadas de reacciones que involucran enzimas específicas, proteínas regulatorias y otros factores; existen muchas señales que generan múltiples formas de respuesta.

En estos procesos el estímulo externo es primero transformado en una señal intracelular a nivel de la membrana plasmática, luego el mensaje intracelular es traducido en actividades regulatorias las cuales finalmente modifican y regulan las proteínas involucradas en la respuesta biológica. Los estímulos externos generan algunas moléculas conocidas como segundos mensajeros, incluyendo los nucleótidos cíclicos, calcio, diacilglicerol, fosfoinosítidos y metabolitos del ácido araquidónico.

Los nucleótidos cíclicos intervienen virtualmente en cada función celular y frecuentemente de manera concertada con otros segundos mensajeros. Una proteína reconoce al segundo mensajero y entonces adquiere la capacidad de modular a otras proteínas específicas. Entre los nucleótidos cíclicos, el cAMP fue uno de los caracterizados como un importante segundo mensajero (1), y será la cascada del cAMP en la que ahondaremos.

La existencia de cascadas de quinasas de proteínas fue determinada con el descubrimiento, hace mas de 20 años, de la fosforilación y consecuente activación de la fosforilasa quinasa en respuesta a un aumento en los niveles de cAMP. El uso de estas cascadas en la transducción de señales es muy interesante ya que en principio estas permiten la amplificación de la señal o su regulación negativa además de la interrelación con otros caminos de señalización. En general en una cascada intervienen muchas enzimas las cuales

responden a distintos reguladores, permitiéndose de esta manera alcanzar un alto grado de amplificación de la señal.

En una amplia gama de organismos procariotas y eucariotas (2-4), se ha probado la existencia de cAMP. Este nucleótido cíclico estimula la transcripción de varios operones de células procariotas por unión a una proteína denominada CAP (catabolite gene activator protein) o CRP (cAMP receptor protein). En eucariotas superiores, en cambio, el cAMP no está usualmente involucrado en la estimulación directa de la transcripción sino que tiene un rol de segundo mensajero en una amplia variedad de funciones.

La generación de cAMP es catalizada por la enzima denominada adenilato ciclasa, en respuesta a una variedad de señales extracelulares via la acción de una cascada asociada a membrana. Las proteínas G son las que funcionan como intermediarios en este camino de señalización a través de la membrana. Entre los efectores con los cuales interactúan las proteínas G se encuentra la adenilato ciclasa. En un esquema general, cuando un receptor es activado por una hormona u otro ligando modula la actividad de la proteína G, la cual interactúa con la adenilato ciclasa regulando así la velocidad de síntesis del cAMP(5) (figura 1 A).

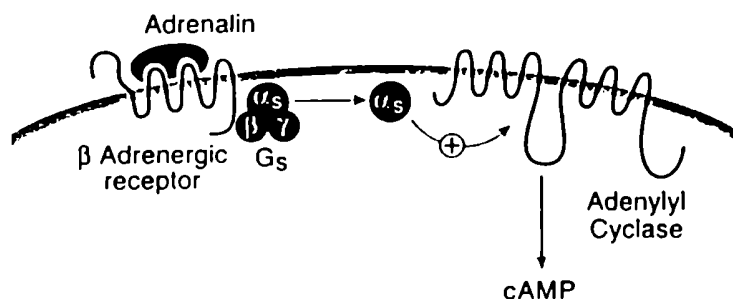
Las proteínas G son heterotrimeros formados por la subunidad α , que une GTP/GDP, y un complejo formado por las subunidades β y γ que se encuentran asociadas. Las funciones de las proteínas G son reguladas ciclicamente por asociación de GTP con la subunidad α , la hidrólisis de GTP en GDP y P_i , y finalmente la disociación del GDP. Después de la activación de la

proteína G por un receptor asociado a un ligando agonista, el GDP es liberado de la subunidad α e intercambiado por GTP. La unión del GTP produce cambios conformacionales que provocan la disociación de esta subunidad del dímero $\beta\gamma$. El estado de activación se mantiene hasta que el GTP es hidrolizado. La subunidad G_{α} tiene actividad GTPasa intrínseca modulable e hidroliza el GTP produciendo GDP. Una vez que se produce esto la subunidad α se reasocia con las subunidades $\beta\gamma$ y por lo tanto se inactiva (figura 1 B).

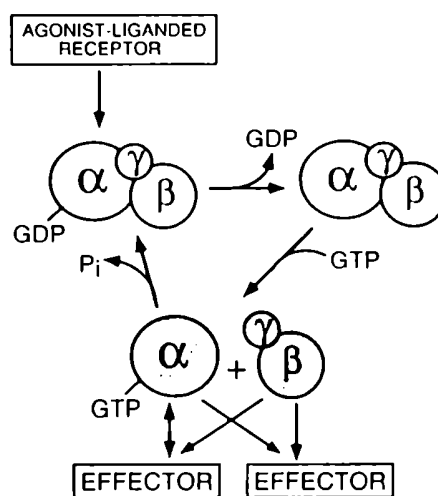
La adenilato ciclasa es estimulada por la subunidad α de la proteína G estimuladora G_S . La inhibición de la adenilato ciclasa es mas compleja ya que tienen regulaciones inhibitorias tipo-específicas en las que intervienen otras subunidades de G como la $G_{i\alpha}$ y el complejo $\beta\gamma$. (5,6).

Se han identificado y descrito varias isoformas de adenilato ciclasa. En mamíferos la mayoría de éstas están asociadas a la membrana plasmática (7), tambien se detectó actividad adenilato ciclasa en bacterias (8-11), hongos (12-18), protozoarios (19,20) y plantas (21).

Hay por lo menos tres clases generales de adenilato ciclasas unidas a membrana. Las unidas a la periferia de la membrana como en *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*, las que parecen tener un solo dominio transmembrana y la forma más común en eucariotas superiores que incluye una región amino terminal y dos dominios citoplasmáticos mantenidos unidos a la membrana por dos zonas altamente hidrofóbicas que contienen seis hélices transmembranas (22). Este último grupo corresponde a las adenilato ciclasas



A



B

Figura 1:

A- Regulación de las adenilato ciclasas de mamíferos. R: receptores asociados a proteínas G; G_s y G_i : proteínas G que estimulan e inhiben a la adenilato ciclasa, respectivamente.

B- Ciclo regulatorio de proteínas G heterotriméricas. Los círculos vacíos representan los estados inactivos de las subunidades; los círculos coloreados representan las formas activas.

que responden a la regulación inhibitoria o estimuladora por hormonas y neurotransmisores, actuando via un receptor y una proteína G.

Las diversas formas de adenilato ciclasas reflejan el amplio rango de estímulos regulatorios a los que responden. En un extremo está la enzima de *Streptococcus salivarius* que es dependiente de α -ceto ácidos para su actividad y no de proteína G. La enzima de mamíferos representa el polo opuesto , ya que posee una regulación compleja para su activación e inhibición, en la que intervienen las subunidades α y $\beta\gamma$ de la proteína G, el Ca^{++} -calmodulina, forskolina e inhibidores de sitio-P (22). La adenilato ciclasa de *Saccharomyces cerevisiae* es estimulable por una proteína que une GTP, como las enzimas de mamíferos. Esto indica que esta forma de regulación es importante ya que está establecida en un organismo primitivo. Sin embargo esta proteína que une GTP y es estimuladora de la adenilato ciclasa es la proteína monomérica Ras, y no la heterotrimérica G (que también posee esta levadura)(23). El ligando y el receptor que activan a Ras aún no han sido identificados.

El cAMP sintetizado por la adenilato ciclasa se libera de la membrana y difunde en la célula. Los procesos controlados por este nucleótido en sistemas eucariotas son mediados principalmente por la Quinasa de Proteínas dependiente de cAMP (PKA). Se ha demostrado que algunas hormonas que actúan sobre la PKA, son capaces de mediar la distribución de cAMP en la célula, creando zonas compartimentalizadas de concentración de este nucleótido (24). La acumulación compartimentalizada del cAMP, resulta en la activación selectiva de una isoforma particular de PKA, la cual a su vez también

se encuentra compartimentalizada en sitios determinados a través de su anclaje a proteínas específicas, permitiéndose una rápida y preferencial fosforilación de un sustrato (25). Esta quinasa al igual que las demás proteínas quinasa, modifica la actividad de sus proteínas blanco por fosforilación , generando así una amplia variedad de respuestas.

La fosforilación de proteínas es un mecanismo rápido, reversible y covalente, por medio del cual la célula puede alterar la actividad de proteínas específicas en respuesta a señales extracelulares o intracelulares, las cuales tienen la función de controlar rápidamente una variedad de procesos celulares. Los blancos fosforilables pueden ser proteínas estructurales y regulatorias (26,27); a veces una simple fosforilación puede actuar como interruptor de la cascada regulatoria mientras que otras veces la respuesta global se produce por acumulación de fosforilaciones sucesivas (27).

Para terminar este proceso de transducción de señales, existen por lo menos dos mecanismos conocidos, que son la hidrólisis del segundo mensajero, que es llevada a cabo por las fosfodiesterasas para el nucleótido cíclico y la regulación de la señal a nivel del receptor, ya sea por fosforilación que lo insensibilice a la estimulación ulterior, o por internalización del mismo receptor que lo haga inaccesible al agonista. Se han hallado múltiples formas de fosfodiesterasas en eucariotas superiores (29), plantas (30), bacterias (31), hongos (32-37) y protozoarios (28). Las formas difieren en cantidad, localización subcelular, afinidad y especificidad por los sustratos, respuesta a efectores y mecanismos de regulación.

Por otro lado aparecen como último paso en la cascada de señales las fosfatasas de proteínas, las cuales remueven el fosfato a las proteínas que han sido fosforiladas por las quinasas, revirtiendo la acción de estas últimas.

Las fosfatasas se han identificado primero en mamíferos pero luego se han encontrado también en plantas, protozoos, hongos, levaduras, vertebrados e invertebrados (38).

Tanto las fosfodiesterasas como las fosfatasas están altamente reguladas. Las fosfodiesterasas son moduladas por fosforilación, Ca^{++} -calmodulina y cGMP. Las fosfatasas son reguladas por la combinación del efecto de subunidades regulatorias, inhibidores específicos y su localización. La posibilidad de regular estas proteínas agrega a estos sistemas flexibilidad y sensibilidad.

Cientos de quinasas de proteínas y fosfatasas controlan un amplio rango de eventos tales como la división celular, señalización celular, diferenciación y metabolismo. En muchos casos una sola enzima está involucrada en la regulación de múltiples procesos diferentes. El mecanismo por el cual estas enzimas seleccionan el sustrato correcto en el momento adecuado no está aún dilucidado. Un factor involucrado en la elección del sustrato es la misma estructura del sustrato, otro factor importante en esto es la distribución celular de las actividades quinasa y fosfatasa. Recientemente se ha demostrado que las quinasas y las fosfatasas están ubicadas en compartimientos específicos y son translocadas dinámicamente durante los eventos celulares (39).

QUINASAS DE PROTEÍNAS

Hace diez años atrás había menos de una docena de quinasas de proteínas caracterizadas; esta lista creció y actualmente se expande rápidamente. Hasta la fecha se han identificado, sólo en mamíferos, más de cien quinasas de proteínas diferentes, codificadas por distintos genes. Muchas otras han sido identificadas en una amplia variedad de otros eucariotas, incluyendo hongos, plantas, bacterias y algas. Se postula que el genoma de mamíferos codificaría para cerca de 2000 proteínas quinasas diferentes (40,41).

La primer quinasa de proteínas purificada fue la fosforilasa quinasa en 1959 (42), seguida por la quinasa de proteínas dependiente de cAMP en 1968 (43). Luego en 1979 se purificó la primer tirosina quinasa pp60^{vsrc}(44), seguida en 1982 por el receptor de EGF(45). Desde 1980 el número de proteínas quinasas identificadas ha ido aumentando rápidamente y se ha utilizado el clonado molecular más que la purificación enzimática.

Las quinasas poseen especificidad en cuanto al aminoácido que fosforilan, o sea el aminoácido aceptor del fosfato. Los grupos de aminoácidos aceptores son :

- 1) Serina/ Treonina
- 2) Tirosina
- 3) Histidina/ Aspártico

Ejemplos del grupo 1 tenemos a la PKA (quinasa dependiente de cAMP), PKC (quinasa C de proteínas), CaMK (quinasa dependiente de Ca^{++} -calmodulina), CK (Caseína quinasa), Raf quinasa, MAPK (quinasa de proteínas activada por mitógeno), IF-2 quinasas: HRI quinasa y PKR (quinasas que fosforilan el factor de iniciación de síntesis proteica IF-2, quinasa dependiente de hemo inhibitoria), CDK (quinasa dependiente de ciclinas), CAK (quinasa activadora de CDK), DNA-PK (quinasa de proteínas dependiente de DNA), son algunos ejemplos. Finalmente dentro de este grupo, están las quinasas dirigidas a Prolina como las ERKs (quinasa regulada por señales extracelulares), un subgrupo de las MAPK, que fosforilan secuencias en un contexto Ser/Tre-Pro.

Entre las quinasas que fosforilan en Tirosina está la familia de tirosina quinasas Src que se encuentran en su mayoría asociadas a la membrana intracelular, los receptores tirosina quinasa como el receptor para insulina, el receptor de EGF, receptor de PDGF, etc. Dentro de este grupo también están las tirosina quinasas citoplasmáticas sin afinidad aparente por la membrana como la quinasa *abl* Tipo I.

La MAPKK, sería una quinasa perteneciente a ambos grupos ya que fosforila en Treonina y Tirosina.

Las histidina/ aspártico quinasas son proteína quinasas que se han descubierto en bacterias que se autofosforilan en un residuo histidina y transfieren este fosfato a un aspártico. Se han encontrado en eucariotas secuencias homólogas a estas, pero no se detectó actividad quinasa de este tipo, salvo en *Saccharomyces* (46).

Muchas proteínas quinasas son reguladas positivamente por ligandos específicos, así por ejemplo las tirosinas quinasas que son receptores de factores de crecimiento, se estimulan por la unión del factor respectivo. Otras quinasas son reguladas por segundos mensajeros. La actividad de estas proteína quinasas reguladas por ejemplo por nucleótidos cíclicos, se aumenta por elevación de los niveles de los nucleótidos cíclicos, generados por las ciclasas correspondientes (PKA, PKG); la familia de la quinasa C de proteínas es estimulada por diacilglicerol, producido por un aumento en la velocidad de recambio de los fosfoinosítidos. También hay proteína quinasas que son reguladas por cambios en la concentración de Ca^{++} , siendo esta regulación mediada por calmodulina (CaMK, MLCK). Finalmente están las quinasas reguladas por RNA doble cadena y por hemina (IF-2 quinasas: HRIK y PKR), las reguladas por ciclinas (CDKs), quinasas que son activadas por fosforilación (MAPK, MAPKK, Raf) y varias de las que no se conocen sus moduladores.

Las proteína quinasas parecen tener estructura modular. El único módulo que es común a todas y comparte gran similitud de secuencia es el correspondiente a la subunidad catalítica. Los módulos no catalíticos son importantes en la regulación, la localización subcelular y en determinar relaciones proteína-proteína involucradas en complejos de proteínas quinasas. Los módulos no catalíticos, regulatorios, no tienen secuencias conservadas, pueden estar hacia la terminación amino o carboxilo del módulo catalítico y tienen tamaños muy variables. Pueden además, estar unidos a la membrana, atravesar la membrana o ser parcialmente extracelulares.

Estos módulos frecuentemente poseen un sitio de unión al ligando. Cuando este sitio es ocupado se produce un cambio conformacional que conduce a la activación de la subunidad catalítica (47). Esta activación puede estar mediada por varios mecanismos dentro de una sola quinasa como por ejemplo unión del ligando y posterior autofosforilación , como ocurre con el receptor para EGF (48).

Dentro de la familia de quinasas de proteínas, la quinasa de proteínas dependiente de cAMP es única , ya que es la única regulada por interacción con una subunidad dissociable y distinta de la subunidad catalítica; esta última es además una de las subunidades catalíticas mas simples de las proteína quinasas (47).

QUINASA DE PROTEÍNAS DEPENDIENTE DE cAMP

La PKA es una de las mas simples y pequeñas entre las quinasas de proteína y es de las que mas se conoce el comportamiento bioquímico.

La variedad de respuestas fisiológicas producida por la PKA es controlada a través del camino de señalización del cAMP. Una de las pocas excepciones en donde una respuesta a cAMP no es mediada directamente por la PKA es la quimiotaxis en *Dictyostelium discoideum* (49) y la activación de ciertos canales ionicos (50).

La PKA es un tetrámero formado por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C). La subunidad regulatoria posee dos sitios de unión de cAMP; la unión de este nucleótido a la R altera su afinidad por la subunidad C y promueve la disociación de esta enzima en un dímero de subunidad regulatoria y dos subunidades catalíticas monoméricas activas (51).

Como ya se ha dicho, en la región catalítica la estructura secundaria y terciaria es altamente conservada y muchos residuos esenciales para la catálisis son invariables. Aunque la subunidad regulatoria no es conservada dentro de la familia de quinasas de proteínas, el mecanismo por medio del cual esta subunidad ejerce su control sobre la subunidad catalítica en ausencia de cAMP, es un modelo usado por otras quinasas.

Subunidad Catalítica

La subunidad catalítica activa de la PKA, fosforila sustratos proteicos, generando así una variedad de respuestas fisiológicas controladas por el camino de señalización del cAMP.

La subunidad catalítica es una enzima monomérica cuyo PM es de 40.800 (52-54), (para la PKA de corazón bovino).

Se han identificado tres formas de subunidad catalítica en tejidos de mamíferos $C\alpha$, $C\beta$ y $C\gamma$. Entre $C\alpha$ y $C\beta$ las secuencias de aminoácidos difieren aproximadamente un 7% (54-55). La isoforma $C\alpha$ es expresada constitutivamente en la mayoría de las células, mientras que la $C\beta$ es tejido específica (56,57). La

tercer isoforma de subunidad catalítica $C\gamma$, muestra una identidad del 79% y 83% con $C\alpha$ y $C\beta$ respectivamente (58).

La secuencia de aminoácidos y el tamaño de la subunidad C están altamente conservados entre las especies, en las que se ha clonado esta subunidad (59).

En levaduras existen tres isoformas de C: TPK_1 , TPK_2 , y TPK_3 (60). Estas subunidades catalíticas poseen especificidad de sustrato que se superpone, ya que se vió por medio de experimentos de interrupción de genes, que es sólo necesario uno de los tres genes en la función celular (61).

Estructura de la subunidad catalítica

La subunidad catalítica (figura 2) contiene una región de aproximadamente 250 aminoácidos, común a todas las proteína quinasas, zona que es conocida como núcleo catalítico (62). Esta región está comprendida entre los residuos 40 a 285, y está compuesta de varias secuencias conservadas; así se pueden identificar residuos y regiones que son esenciales para la actividad catalítica, para la unión de ATP-Mg y unión del sustrato. La enzima consiste en dos "lóbulos", uno pequeño de unión de ATP-Mg y uno mayor asociado con el reconocimiento del sustrato peptídico y la actividad catalítica.

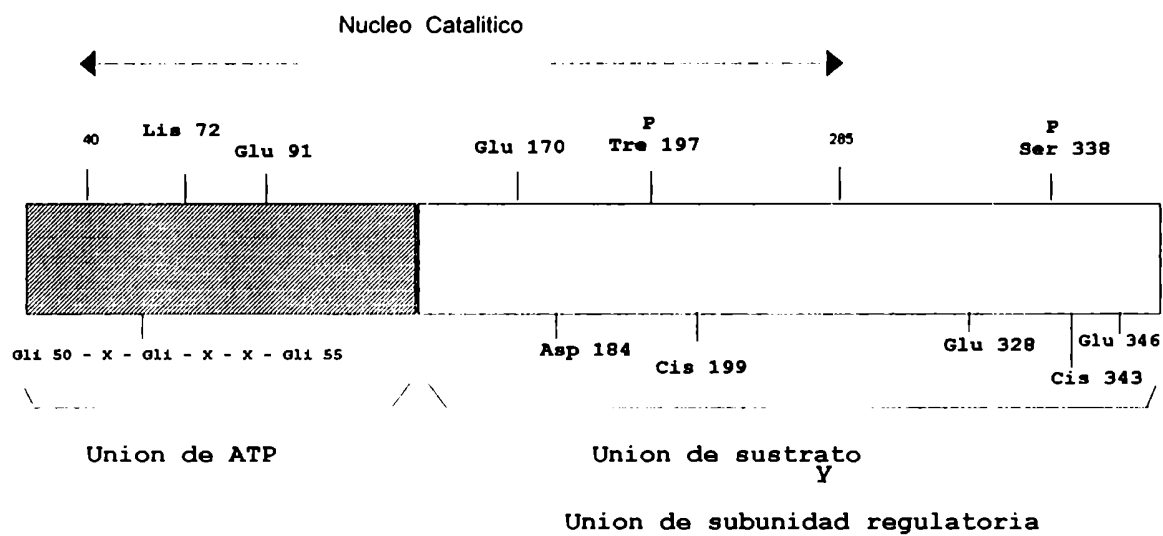


Figura 2:

Subunidad Catalítica de PKA. Estructura de dominios

La estructura tridimensional de la subunidad C de la PKA fue la primera en ser resuelta a través del estudio de la estructura cristalográfica de la subunidad C unida al PKI (péptido inhibidor) (figura 3). Posteriormente se comprobó que esta estructura bilobular era compartida por otras quinasas como la MAPK y CDK.

1-Sitio de unión de ATP

Para que ocurra la catálisis, la subunidad catalítica debe unir el sustrato peptídico y un segundo sustrato que es el ATP. Estos se unen con alta afinidad a sitios diferentes en la subunidad catalítica. El ATP se une en un sitio ubicado en la porción amino terminal de la C. En este sitio se identificó primero a la Lisina 72, como residuo importante haciendo mutagénesis y modificaciones químicas (63). Luego se confirmó que la región flanqueante de este residuo era también importante en la unión de ATP (64); dentro de esta región se vio que las Cisteínas 199 y la 343 estaban también involucradas en la unión de ATP (65).

El núcleo catalítico de todas las proteínas quinasas contiene una lisina o arginina invariable que corresponde al residuo 72 y que interactúa con el γ -fosfato del ATP (63).

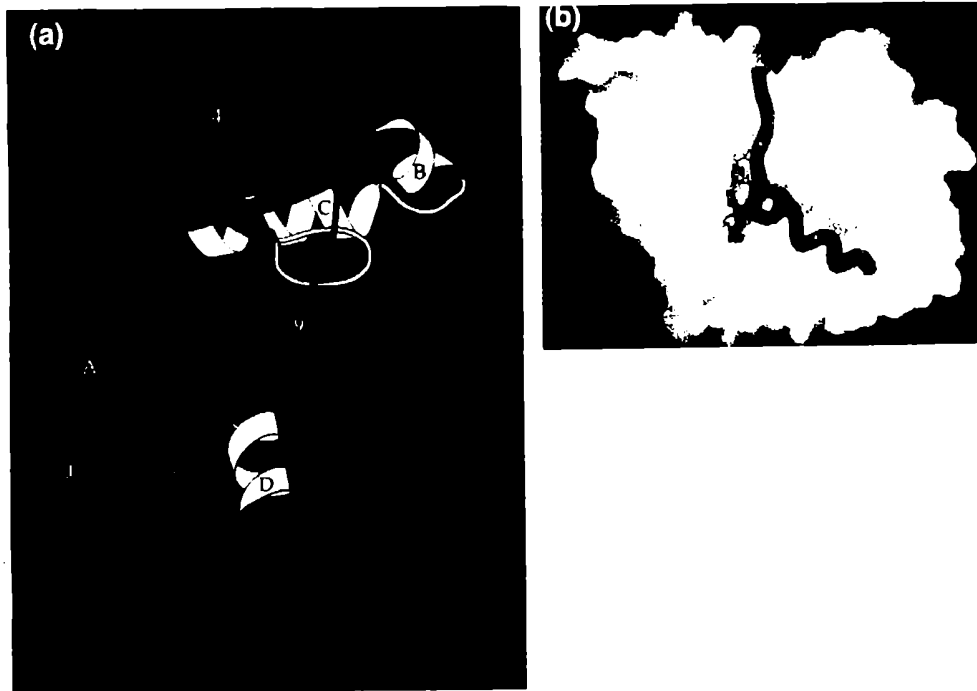


Figura 3:

A- Diagrama de la subunidad catalítica de PKA. Dentro de la estructura bilobular, las α -Helices y las cadenas β son de color verde, excepto D, B y C (amarillas). El PKI (rojo) se une entre las hélices D y G.

B- Representación de superficie de PKA con el PKI (rojo) unido. Los bolsillos hidrofóbicos en las posiciones P-11 y P+1, están en amarillo. Los residuos ácidos responsables de la unión de las Argininas del PKI están representadas de color azul.

La región de unión de ATP está localizada 20 residuos antes de la lisina 72, y esta región posee una secuencia rica en glicinas: *Gly*-Thr-*Gly*-Ser-Phe-*Gly*-Arg-Val, la cual es conservada en todas las quinasas (62); la misma posición de las glicinas está presente en otras proteínas que unen nucleótidos. El modelo propuesto para el plegamiento de este segmento rico en glicinas comienza con una cadena β en los residuos 40-45, seguida por una estructura de hélice α , que contiene la secuencia rica en glicinas y termina con otra cadena β que incluye a la lisina 72 hacia el final de la misma. Esta lisina 72 estaría muy próxima espacialmente a esta región rica en glicinas.

También participan adicionalmente de la unión de ATP grupos carboxilo; estos grupos unen Mg^{++} , formando un complejo ternario con el Mg-ATP.(66); se identificaron dos grupos carboxilo reactivos, aspártico 184 y glutámico 91 (67).

2-Sitio de unión del sustrato y actividad fosfotransferasa

La subunidad catalítica reconoce como sustratos péptidos que contienen dos aminoácidos básicos separados por uno o dos residuos de la serina o treonina que es fosforilada. La actividad catalítica consiste en la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la serina o treonina de la cadena polipeptídica. Grupos carboxilo participan en el reconocimiento y transferencia de fosfato al sustrato peptídico, se cree que es por unión con los residuos básicos del sustrato. Se demostró que el glutámico 170 y un grupo de varios residuos ácidos

que se encuentra en el extremo carboxilo-terminal de la molécula, participarían en el reconocimiento del sustrato (68).

También se identificaron aminoácidos adicionales que estarían involucrados en el reconocimiento del sustrato, la cisteína 199, el glutámico 346 y la treonina 197 formarían también parte también del sitio activo (69). Este último residuo tiene un interés particular ya que está fosforilado en la subunidad catalítica. Se ha demostrado que esta fosfotreonina es necesaria no sólo para el reconocimiento del sustrato sino también para la interacción con la subunidad regulatoria de la quinasa (70). Haciendo sustituciones de este aminoácido por aspártico o glutámico se demostró que era necesario que en la posición de la treonina hubiera un grupo cargado negativamente para que ocurra la unión con la R (71) (figura 4).

La subunidad R posee secuencias denominadas pseudosustrato (ver más adelante, en características de la subunidad R), que son inhibidores competitivos de la subunidad catalítica. Por lo tanto es muy probable que la R reconozca el sitio activo de la quinasa en forma similar a la de los sustratos.

Actualmente además se le asigna un rol importante a la histidina 87 no sólo en la interacción con los sustratos sino también en la interacción con R (72)

La subunidad catalítica sufre cambios conformacionales cuando el sustrato se une a ella.

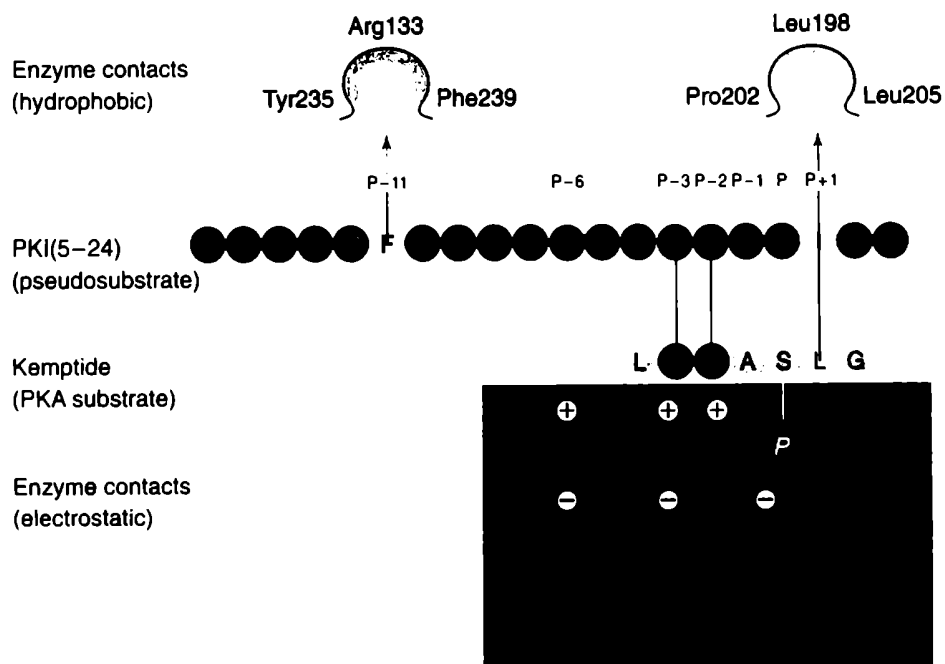


Figura 4:

Interacción de PKA con el PKI y con sustratos. Sitios aceptores hidrofóbicos están en amarillo y sitio aceptor ácido en azul.

Modificaciones post-traduccionales de la subunidad catalítica

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

La función de la miristoilación no es clara pero se cree que contribuye con la subunidad regulatoria para la correcta localización de la PKA.

La fosforilación de la subunidad C ocurre en la treonina 197 y la serina 338 (73). El rol de la fosforilación en Ser-338 aún no está claro, sin embargo la fosforilación en la treonina 197 es importante para la interacción con la subunidad R (71), y recientemente se ha demostrado que esta fosforilación sería el resultado de la autofosforilación y que sería un paso crítico para la activación de la subunidad C (74).

También se ha descrito un sitio adicional a estos dos que sería fosforilado y correspondería a la serina 10, el cual sería también el resultado de autofosforilación, pero no tendría efecto alguno sobre la actividad de la enzima (75).

Subunidad Regulatoria

La función principal de la subunidad regulatoria es la de inhibir a la subunidad catalítica, en ausencia de cAMP. En eucariotas superiores existen dos tipos de subunidades regulatorias, tipo I y tipo II, que se distinguen por su orden de elución en DEAE-celulosa (76). Muestran distinto peso molecular, distinta secuencia de aminoácidos, estado de fosforilación y localización subcelular.

En cuanto a su estado de fosforilación, la R_{II} puede ser fosforilada por la subunidad catalítica mientras que la R_I no (77,78). Se han clonado isoformas de cada tipo de R, $R_{I\alpha}$ (79), $R_{II\alpha}$ (80), que son expresadas en la mayoría de los tipos celulares, aunque varían las proporciones relativas de cada una; por otro lado se ha encontrado que $R_{I\beta}$ (81) y $R_{II\beta}$ (82), son más específicas de tejido. Además la expresión de algunas isoformas parece ser constitutiva y la expresión de otras inducible.

Estructura de dominios de la subunidad regulatoria

La subunidad regulatoria es típicamente un dímero muy asimétrico; esta asimetría parece ser mantenida también en la holoenzima (63). La estructura de dominios de la subunidad regulatoria incluye los dominios de dimerización,

localización subcelular, inhibición de la subunidad catalítica y unión de cAMP (figura 5).

La tercera parte de la molécula del lado amino-terminal participa de las interacciones proteína-proteína, mientras que las dos terceras partes de la molécula, del lado carboxilo-terminal contiene dos secuencias repetidas en tandem las cuales resultaron de la duplicación génica, que conforman los dominios de unión de cAMP.

Tanto la R_I como la R_{II} son fosforiladas por otras quinasas de proteínas, la R_I es fosforilada por PKG, en una serina próxima al sitio de pseudosustrato (83), la R_{II} es fosforilada en la serina-95 por la misma PKA (84), y además tiene otros cuatro sitios de fosforilación más que están entre los residuos 44 y 76, y son fosforilados por la glucógeno sintetasa quinasa y la caseína quinasa II (85).

1-Dimerización de la subunidad R

La subunidad regulatoria es un dímero estable, que permanece intacto después de la liberación de las subunidades catalíticas. Las únicas subunidades regulatorias que no forman dímeros son las de *Dictyostelium discoideum* (87) y *Saccobolus platensis* (86). La primera contiene una deleción del amino terminal (87).

En R_I , los monómeros están unidos covalentemente por uniones disulfuro formadas entre la Cis-16 y la Cis-37 (88). La dimerización de R_{II} no

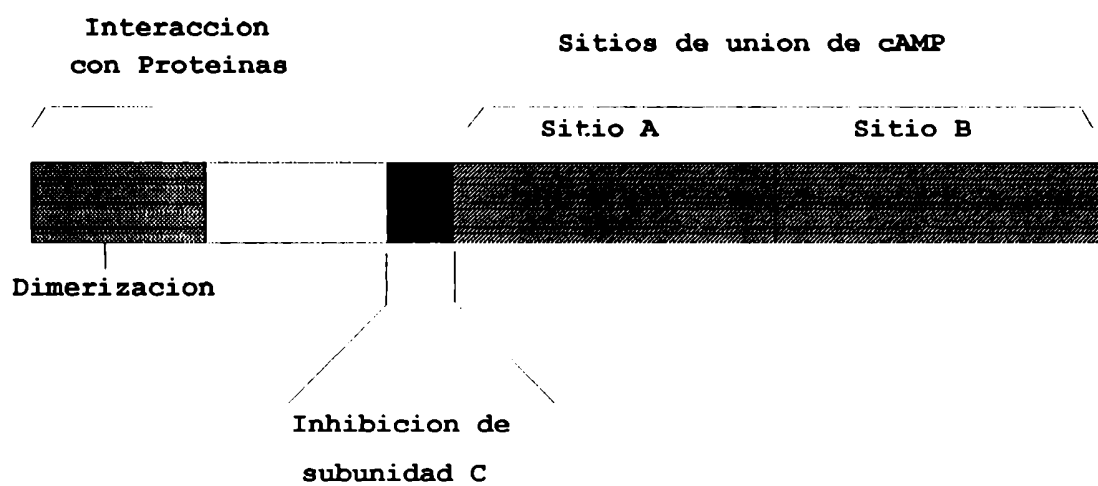


Figura 5:

Subunidad reguladora de PKA. Estructura de dominios.

involucra cisteínas, sino que es mantenida por interacciones entre los residuos de la terminación amino. Se demostró que el clivado proteolítico hasta el residuo 45 generaba R_{II} monoméricas (89,90); posteriormente se demostró que por deleción de sólo los primeros 14 residuos se evita la dimerización (91). Haciendo quimeras con proteínas carrier se demostró que los primeros 30 residuos permitían la dimerización (92). Así quedó determinado que los residuos 1-30, representan un dominio de dimerización.

Localización subcelular

La localización subcelular de la PKA está dirigida por la subunidad R. La R_I es principalmente citoplasmática y la R_{II} es generalmente particulada y está asociada a la membrana citoplasmática, citoesqueleto, gránulos secretorios o membranas nucleares. La localización de la R_{II} está dada por la asociación de esta subunidad con proteínas específicas denominadas "proteínas de anclaje" o "AKAPs" (A Kinase Anchoring Proteins) (25,93-96). Se cree que la función tejida específica está dada por esta localización subcelular por las proteínas de anclaje, lo que haría que los sustratos fueran más accesibles a la quinasa. Se ha demostrado que varias de las proteínas identificadas como de anclaje para la R_{II}, son sustrato de la PKA, por lo tanto estas proteínas tendrían un rol muy importante en la transducción de señales por cAMP.

2-Inhibición de la subunidad catalítica

La función principal de la subunidad regulatoria es la inhibición de la subunidad catalítica en ausencia de cAMP. La región principal, pero no la única, que es esencial para la interacción con la subunidad catalítica, es la región conocida como "hinge" o "bisagra", que yace entre los residuos 90 y 100 en la subunidad regulatoria. Esta zona es sensible al clivaje proteolítico, en particular a la tripsina. Esta región es protegida del ataque proteolítico cuando la R forma parte de la holoenzima. Por modificación de las argininas de R_{II} con 2,3-butanodiona, se demostró que estos residuos eran importantes en la interacción con C (97). Se demostró que las secuencias presentes en esta región son semejantes a las presentes en los sustratos que son fosforilados por la subunidad C (98). La subunidad R_I posee, en esta región, una secuencia de pseudosustrato o pseudofosforilación **Arg-Arg-Gly-Ala/Gly-Ile-Ser** en la cual la Ser que es fosforilable está remplazada por una Ala o Gly. La R_{II} tiene un sitio para la autofosforilación en la secuencia **Arg-Arg-Val-Ser-Val-Cys**. La autofosforilación de la serina reduce la afinidad de la R por la C casi 10 veces (84).

Por proteólisis del amino-terminal dejando esas dos argininas se produce una subunidad R que puede unir C, pero si la proteólisis alcanza a las argininas, la R no puede formar un complejo de alta afinidad con C; por mutagénesis dirigida se demostró que por lo menos una de las dos argininas conservadas en la región "bisagra" es necesaria para la unión fuerte entre R y C (99,100).

Además de la subunidad regulatoria, la subunidad catalítica puede ser inhibida por la proteína inhibidora termoestable PKI, la cual posee un sitio de pseudofosforilación como la R_I , y es un inhibidor competitivo con respecto a los péptidos sustratos (101,102). Esta inhibición no puede ser revertida por cAMP.

3-Unión de cAMP

Cada monómero de R posee dos sitios de unión de cAMP, los cuales están localizados después del sitio de dimerización y la región de pseudosustrato. Estos sitios son denominados sitio A y sitio B, y son el resultado de duplicación génica (103). Ambos sitios tienen diferentes velocidades de intercambio de cAMP y especificidades por los análogos de cAMP. 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 (103). Estos sitios actúan de manera sinérgica durante la activación de PKA (104). Los dominios de unión de cAMP muestran similitud de estructura con la proteína CAP o CPR de *E.coli* (105). El dominio de unión de cAMP está formado por tres hélices α y ocho cadenas β , que se distribuyen espacialmente para formar un bolsillo al cual se une el nucleótido cíclico (figura 6). Se ha puntualizado que tres residuos Glicina parecen ser esenciales para mantener la integridad estructural de las cadenas β ; además se determinó que son esenciales tres residuos Glu, Arg y Ala.

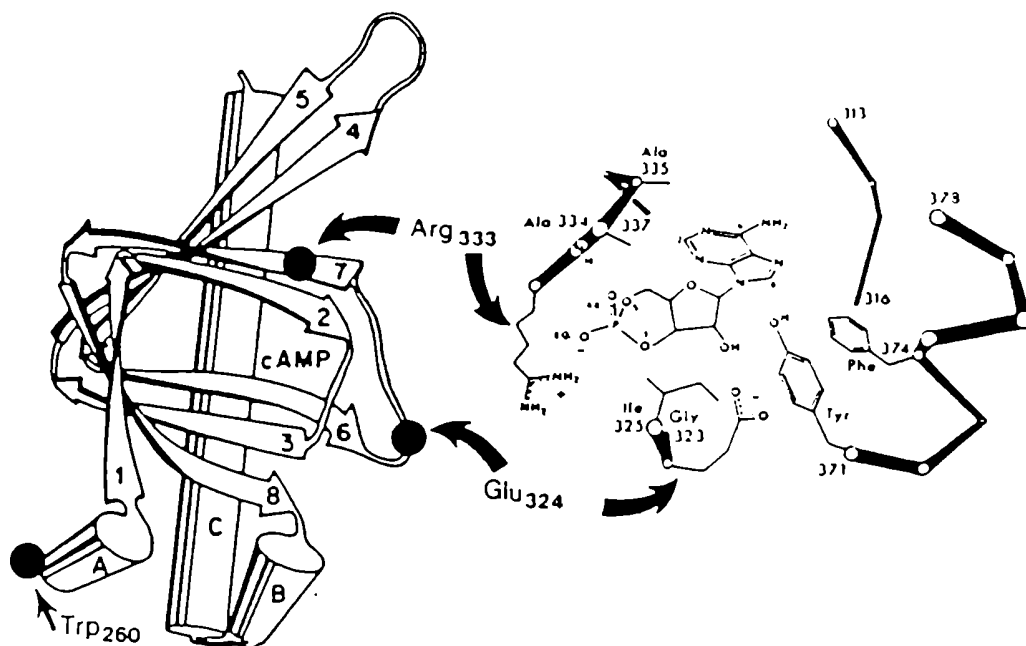


Figura 6:

Modelo para el dominio B de unión de cAMP, basado en la estructura cristalina de CAP.

A la derecha están representadas las estructuras de plegamiento, a la izquierda se muestra el entorno de unión de cAMP, Están destacados la Arg 333 y el Glu 324, y el Trp 260 que está justamente en el límite entre el dominio A y el dominio B.

Mutaciones en alguna de las Glicinas o cualquiera de los otros residuos del bolsillo impide la unión del cAMP. La alanina tiene función desconocida, mientras que el glutámico y la arginina contactan con el cAMP .

Existen interacciones entre los dos sitios de unión de cAMP, que son de naturaleza diferente en la holoenzima y en la subunidad R libre. La unión de cAMP al sitio A de la R libre, limita la disociación del cAMP unido al sitio B y a su vez limita la entrada de cAMP al sitio B. Estos dos efectos (disminuir la probabilidad tanto de la disociación como de la asociación de cAMP al sitio B) se anulan uno al otro, de manera tal que en la subunidad R libre no hay un efecto neto de la ocupancia de un sitio sobre la afinidad de cAMP en el otro.

En la holoenzima , la unión de cAMP a un sitio aumenta la afinidad por este nucleótido del otro sitio. Por lo tanto la unión a un sitio aumenta la probabilidad de unión estable del nucleótido al otro sitio en el complejo $R_2C_2cAMP_2$, y una vez que ambos sitios han sido ocupados, la subunidad C tiene mayor probabilidad de disociarse de la R.

Activación y reasociación de la holoenzima

Se ha estimado que el orden de la constante de afinidad entre la subunidad R y C es del décimo de nM y se determinó que el cAMP puede cambiar el equilibrio entre R_{II} y C casi 20000 veces llevando así el valor de la constante al orden de μM .

El cAMP disminuye la afinidad entre R y C por dos mecanismos. Por un lado se cree que se induce un cambio conformacional que afecta a la región "bisagra", la cual ya hemos dicho que es la principal región involucrada en la inhibición de C por R. Por otro lado se postula que se induciría un cambio conformacional de R que alteraría regiones de contacto entre R y C fuera de la región "bisagra". También se propone un modelo que sería la combinación de ambos efectos (106).

Si bien el cAMP induce la disociación de la holoenzima ($K_d=300-1000$ nM, para sitio A y sitio B respectivamente), a concentraciones extremadamente bajas de enzima la PKA se disocia en ausencia de cAMP; por el contrario a concentraciones muy altas de enzima, la holoenzima persiste aún a concentraciones saturantes de cAMP (106).

La holoenzima de tipo I, une Mg-ATP con alta afinidad y existe en la célula como un complejo ternario conteniendo R, C y Mg-ATP. El Mg-ATP se une 100 veces más fuerte a la PKA que a la subunidad C, por lo tanto estabiliza la holoenzima. El Mg-ADP tiene una afinidad mucho menor por la PKA que por la C, esto significa que el Mg-ADP no va a favorecer la formación de la holoenzima. La reasociación de la subunidad catalítica con la subunidad reguladora saturada con cAMP ocurre muy lentamente en ausencia de Mg-ATP. Por lo tanto la rápida reasociación de la subunidad catalítica con la subunidad reguladora y la consecuente liberación de cAMP necesita el complejo binario de subunidad C-Mg-ATP. En ausencia de Mg-ATP la subunidad catalítica no

asume la conformación óptima para que se produzca la liberación de cAMP y se forme la holoenzima.

Se sabe menos de la afinidad por cAMP y por Mg-ATP de la PKA tipo II, y además la autofosforilación hace mas complicado el análisis. El cAMP cambia el equilibrio entre R_{II} y C. El Mg-ADP aumenta la reasociación entre P- R_{II} o R_{II} y C, lo cual sugiere que el Mg-ADP tiene mayor afinidad por la holoenzima que por C libre. También se vió que la subunidad C tiene disminuída la afinidad por R fosforilada, en comparación con la R no fosforilada (77,78) y que además la forma fosforilada disocia a una menor concentración de cAMP que la holoenzima defosforilada (78). La defosforilación podrá ocurrir después que la holoenzima se disocia, cuando la P-Ser se hace accesible a las fosfatasas; por lo tanto en el caso de la PKA tipo II, en teoría, la reasociación se vería facilitado por la participación de fosfatasas (47).

Especificidad de sustrato de la PKA

La PKA fosforila muchas proteínas. Aunque los sustratos muestran poca similitud aparente, deben tener alguna estructura en común que es reconocida por el sitio activo de la PKA. Primero se propuso que el común denominador sería una adecuada estructura tridimensional del sustrato (107). Pero luego Kemp (108) estudiando variantes de la β -caseína, tuvo evidencia de la importancia de la estructura primaria en la región de la Serina fosforilable. Posteriormente se identificó a la piruvato quinasa como sustrato de la PKA y

finalmente que un fragmento obtenido con bromuro de cianógeno, de esta enzima, era mejor sustrato aún que la proteína entera (109). Cuando se determinó la secuencia de aminoácidos de la piruvato quinasa de hígado porcino y de rata, fue posible sintetizar péptidos que resultaron ser excelentes sustratos, con valores de K_m del orden de la concentración de la piruvato quinasa *in vivo*. Se definió así un heptapéptido con una secuencia consenso que fue sintetizado por Kemp (110), este sustrato se denominó Kemptido y ahora sirve como sustrato universal para la PKA. La secuencia de este heptapéptido es **Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly**. Haciendo estudios de sustitución de aminoácidos en el Kemptido, se demostró la importancia de los residuos arginina ubicados hacia el lado amino de la serina fosforilable (111). Cambios en la posición de esas argininas ya sea ubicándolas más próximas o más lejanas de la serina aceptora de fosfato, o la sustitución de estas argininas por lisina hacen que el péptido sea un pobre sustrato de la PKA. Por lo tanto de esto surge que las propiedades cinéticas de sustratos óptimos no soportan alteraciones estructurales de las proteínas sustrato .

Estudios de estructura cristalina de la subunidad C unida al PKI, apoyan la idea que sostiene que la unión a una secuencia específica de aminoácidos es necesaria para una interacción óptima de alta afinidad. Se demostró que la mayoría de los sitios de unión del PKI están ubicados en el lóbulo menor de la subunidad C. Existen residuos ácidos que son importantes para hacer contactos de tipo electrostáticos con los residuos arginina del PKI. También se identificaron interacciones no electrostáticas entre el PKI y la C, se determinó

que residuos hidrofóbicos ubicados a ambos lados de la serina fosforilable (P⁺¹ y P⁻¹¹), se unirían a un bolsillo ubicado en el lóbulo menor. Por inferencia se postulan estos sitios de contacto para las proteínas sustrato (112) (figuras 3 y 4).

De todo esto surge que hay un grupo de interacciones específicas que son esenciales para la unión óptima de una proteína sustrato a la quinasa. Desviaciones de esa secuencia óptima claramente afectan la posibilidad de las proteínas sustrato de interactuar con el sitio catalítico de la quinasa. Sin embargo analizando los sitios de fosforilación de los sustratos naturales de la PKA, se encuentra que muchos de estos no tienen la secuencia óptima esperada, sino que presentan secuencias que difieren de ésta.

Sustituciones en las argininas clave por lisinas o cambios en la ubicación de estos residuos con respecto a la serina fosforilable, dos situaciones que producen efectos drásticos en la capacidad de un péptido de ser sustrato de PKA *in vitro*, son fenómenos comunes en los sustratos naturales. La sustitución de un residuo hidrofóbico ubicado inmediato a la serina fosforilable del lado carboxilo, es también pobremente tolerado en los péptidos ensayados *in vitro*; sin embargo es otra variación común encontrada en los sustratos naturales.

Esta flexibilidad en la secuencia de los sustratos sugiere que éstos presentan una amplia variedad de afinidades por la quinasa. Los sustratos de una enzima que tiene múltiples sustratos, como es el caso de la quinasa, compiten por la interacción con la enzima; al tener distintas afinidades por la subunidad C, y ser por lo tanto mejores o peores sustratos para la fosforilación

se puede producir un orden temporal en la fosforilación. Por lo tanto la variación de secuencias de los sitios de fosforilación de los sustratos de PKA pueden ser la base del orden en las fosforilaciones.

Los sustratos con diferentes secuencias que rodean el sitio de fosforilación no sólo tendrían afinidades diferentes por la quinasa sino también podrían influir en el proceso intrínseco de catálisis, ya que las diferencias en la unión de los sustratos podría reflejarse en diferencias en la unión de los productos fosforilados. Esto último es un paso limitante de la velocidad del proceso de catálisis (113). Todo esto llevaría a diferentes velocidades de fosforilación, lo cual sería importante en la dinámica de la transducción de la señal, indicando el orden de los eventos de la fosforilación de las proteínas dentro de la célula.

Para considerar una proteína como sustrato de la PKA se debe cumplir que su fosforilación *in vivo* debe surgir en respuesta a un incremento en el cAMP, inducido por un estímulo, y que el sitio donde se fosforila sea el mismo que se fosforila por PKA *in vitro*. Las propiedades funcionales de la proteína deberán sufrir cambios que correlacionen con el grado de fosforilación y éste debe correlacionar con el nivel celular de cAMP. Un importante indicio de que la fosforilación tendría significancia fisiológica sería que la reacción de fosforilación tenga una K_m aparente del orden de su concentración *in vivo* (114).

En la tabla 1 están agrupados los sustratos encontrados para PKA. Se puede apreciar que no todos corresponden a la secuencia consenso **Arg-Arg-X-Ser**.

Glucógeno sintetasa de músculo (1a)	RN I R A P Q W P R R A S C T
Fosforilasa quinasa 1 α	K S E I K Q V E F R R L S I S
Proteína fosfatasa 1	K P G F S P Q P S R R G S E S
Piruvato quinasa de hígado de cerdo	E G P A G Y L R R A S L A
CREB de cerebro de rata	S Q K R R E I L S R R P S Y R
Tirosina hidroxilasa de hígado	A V T S P R F I G R R Q S L I
Subunidad R η de PKA	D V P I P G R F D R R V S V C
Fosfolamban	V Q Y L T R S A I R R A S T I
Receptor de acetil colina γ	P D W Q N D L K L R R S S S V
Pro-ANP	G P R S L R R S S C F
Inhibidor I de proteína fosfatasa	P E A A E Q I R R R R T S P A
PFK\ fructosa bifosfatasa	S S S S S V L Q R R R G S S I
Proteína ribosomal S $_6$	K R Q E Q I A K R R R L S S L
Troponina de corazón de conejo	A G E A K P A P A V R R S D R
Lipasa hormona sensible	H G F W A L T E S M R R S V S
PFK	E H A H L E H I S R K R S G E
Fenilalanina hidroxilasa	V V L G N G V L S R K L S D F
MLCK	T G H A V R A I G R L S S M A
Fructosa bifosfatasa	E I Y N K D K A K S R P S L P
Fosforilasa quinasa β	V L E R R A R T K R S G S V Y
Glucógeno sintetasa de músculo (1b)	C T S S S G G S K R S N S V D
Glucógeno sintetasa de Músculo (2)	P L S R T L S V S
Carboxilasa Acetil CoA	S A L Q D G L A F H M R S S M
ATP Citrato Liasa	G S T S T P A P S R T A S F S
Subunidad Catalítica de PKA (Ser 338)	N F D D Y E E E E I R V S I N

Tabla 1:

Sustratos de PKA que están presentes en mayor concentración en la célula

1) La distribución celular de la PKA no es al azar. Ya han sido mencionadas anteriormente las AKAPs , un grupo de proteínas que se encuentran asociadas a la subunidad R_{II}, manteniendo la PKA en zonas subcelulares específicas. De esta manera proteínas unidas a la PKA o cercanas a su sitio de anclaje serán blancos preferenciales para fosforilación.

Recientemente se ha sugerido la idea de transporte de la PKA o de sus subunidades a sitios subcelulares específicos, al comprobarse que el PKI podría actuar secuestrando C. El PKI actuaría no sólo inhibiendo a la quinasa sino también intervendría en la localización subcelular de C en presencia de cAMP impidiendo su entrada al núcleo o favoreciendo su salida del mismo (115).

La ubicación y el transporte específico de la PKA dentro de la célula pueden servir como mecanismos para dar un cierto orden a la fosforilación de los sustratos.

2) Este punto ya ha sido discutido anteriormente pero podemos decir resumidamente que la secuencia de aminoácidos que rodea a la serina blanco de fosforilación afecta su posibilidad de ser fosforilado por la PKA. Esto está influido también por la estructura terciaria de la proteína. El orden en que son fosforilados los sustratos de una quinasa que posee múltiples sustratos depende en parte de la eficacia de esa proteína de ser sustrato. Así las proteínas se han diversificado y desarrollado para ser mejores o peores sustratos de fosforilación de una determinada quinasa.

3) Una proteína tiene un potencial de ser sustrato que está determinado por la estructura inherente de la proteína; modificaciones en la estructura de esa

proteína pueden alterar ese potencial. Modificaciones covalentes como las fosforilaciones inducen cambios conformacionales en las proteínas, que regulan su habilidad de servir a su vez como sustrato de fosforilación. También pueden ocurrir cambios conformacionales en las proteínas por modificaciones no covalentes, como puede ser la interacción con moduladores alostéricos.

De esta manera se regularía la elección de los sustratos y el orden en el cual estos serán fosforilados por la PKA.

Control de la síntesis y de la degradación de la subunidades de PKA

Dado que las isoenzimas tiene diferentes roles biológicos es importante que la concentración relativa de ellas esté regulada, lo cual es necesario para optimizar la señalización por cAMP cuando la célula pasa de un estado fisiológico a otro.

Primero se pensaba que PKA I y PKA II, estaban diferencialmente expresadas en los tejidos, sin una correlación clara con la función del tejido (116). Luego se determinó que en tejidos sexuales dependientes de esteroides, el incremento en la expresión de $R_{I\alpha}$, correlacionaba positivamente con el crecimiento inducido por la hormona, lo cual llevó a la hipótesis que la PKA I era promotora de crecimiento (117). Una explicación mas razonable sería que el gen de $R_{I\alpha}$ responde generalmente más rápido que el gen para $R_{II\alpha}$ a la demanda

de un incremento en la síntesis de R, como cuando los tejidos crecen rápidamente en respuesta a hormonas, regeneración o realimentación (117,118).

El cAMP mismo, influye sobre la expresión de PKA. Se ha visto que el cAMP induce $R_{I\alpha}$ y $R_{II\beta}$ en distintas líneas celulares (119,120). En respuesta a altos niveles de cAMP puede ocurrir una regulación negativa de la actividad de PKA, como consecuencia de una disminución en los niveles de subunidad C, presumiblemente por la acción de una proteasa con eficiencia particular por la subunidad C libre (121). La regulación negativa de la PKA también se puede alcanzar por un aumento en los niveles de la subunidad R, relativos a C (118,122). Se encontró una secuencia consenso de respuesta a cAMP en el promotor de $R_{I\alpha}$, que podría explicar la transcripción estimulada por cAMP (123) de esta subunidad. Aunque se ha demostrado la estabilización de R_I por cAMP (124) es más común que el cAMP promueva la degradación de R por proteólisis diferencial de la R libre después de su disociación de C (125). El cAMP puede aumentar los mRNA de $R_{II\beta}$, por activación transcripcional y por estabilización del mRNA (123,119).

QUINASA DE PROTEÍNAS DEPENDIENTE DE cAMP DE *Mucor rouxii*

La quinasa de proteínas dependiente de cAMP (PKA) del hongo *Mucor rouxii* es una enzima tetramérica, R_2C_2 , en la cual cada subunidad R tiene un peso molecular de 75 Kd (126). Se determinó la existencia de dos sitios de unión de cAMP por monómero de subunidad regulatoria, como en la de los eucariotas superiores, existiendo cooperatividad positiva entre ellos. También como en la enzima de mamíferos hay sinergismo en la activación de la enzima por análogos específicos de uno y otro sitio (127).

Se ha reportado que esta quinasa de proteínas presenta la propiedad inusual, de no ser disociada por cAMP solo (128). Por incubación de la holoenzima con cAMP se forma un complejo ternario R_2C_2 -cAMP₂ (129), en el cual el cAMP se une sólo al sitio 1 (127). La disociación de la enzima se logra cuando se agrega NaCl, histona o protamina junto con el cAMP(128,129); bajo esas condiciones los cuatro sitios son entonces ocupados (127).

Se estudió también la influencia del sustrato proteico en la disociación de la PKA por cAMP y se observó que la activación por sustratos básicos como protamina e histona era mayor que por el heptapéptido sintético kemptido. Se encontró además que los policationes: polilisinas, histonas y poliaminas, producen estimulación en la activación de esta enzima por cAMP cuando se usa kemptido como sustrato. Se postuló, a partir de estos resultados, que la

presencia de dominios básicos en el sustrato proteico o la presencia de poliaminas tiene gran importancia en la activación de la quinasa de proteínas de *M.rouxii* (130) por cAMP.

Se demostró también la existencia de una forma de holoenzima dimérica, que se denominó R'C cuyo peso molecular es de 88.000 . Se 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 (127,131).

Se han descrito quinastas dependientes de cAMP en otros eucariotas inferiores. En *S.cerevisiae* (132), *D.discoideum* (133), *C.elegans* (134), *B.emersonii* (135), *U.maydis* (136) se describió un solo gen que codifica para la subunidad R. Para la subunidad C se describió un solo gen en *C.elegans* (137) y *B.emersonii* (138), mientras que para *S.cerevisiae* se han aislado tres genes (139).

Por ensayos bioquímicos se ha descrito además actividad quinasa dependiente de cAMP en *N.crassa* (140), *T.cruzi* (141), *S.platensis* (86), *U maydis* (142), *Paramecium tetraurelia* (143).

DIFERENCIACIÓN EN HONGOS - CONTROL POR cAMP

En hongos, el cAMP controla numerosas funciones; Pall (4) propuso seis criterios que debían cumplirse para considerar que una función específica es controlada por cAMP : 1) correlación entre los niveles endógenos de cAMP y

la función propuesta , 2) correlación de la activación de la PKA con la función propuesta, 3) influencia sobre esa función del cAMP o sus análogos, 4) influencia sobre esa función de drogas que afecten la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa de cAMP, 5) cambios en esa función en mutantes con niveles aumentados o disminuídos de cAMP, 6) control por cAMP de la función en un sistema libre de células. Para sugerir un rol para cAMP en la diferenciación de los hongos deberían cumplirse uno o mas de estos criterios. Aunque la morfogénesis es un proceso complejo , la reacción esencial para que se produzca la morfogénesis de los hongos está relacionada con la cascada del cAMP (4).

Un tipo simple de diferenciación en hongos es la esporulación. La elección entre continuar en mitosis o entrar en meiosis y esporulación es hecha en la fase G1 del ciclo celular en *Saccharomyces*, donde está involucrada la cascada de cAMP (144). Tipos mas complejos de diferenciación se pueden observar en la morfogénesis de las hifas, formación de cuerpos de fructificación en hongos y el dimorfismo. Se ha demostrado en *Saccharomyces*, que en el inicio de la meiosis, se necesita un nivel bajo de cAMP o la ausencia de actividad de PKA (145); tambien que altos niveles de cAMP son necesarios para la esporulación normal de levaduras (145).

Hay evidencias tambien del control de la germinación por cAMP, ya que durante un tratamiento térmico de esporas de *Phycomyces blakesleeanus* la actividad de la fosfodiesterasa de cAMP se reduce significativamente y se observa un incremento rápido y transiente en el cAMP (146). Este incremento

precede el aumento observado en la actividad de trehalasa, sugiriendo que la activación de trehalasa es debida a fosforilación dependiente de cAMP, tal como ocurre en un sistema *in vivo* (147). A diferencia de estas esporangiosporas las de *M.rouxii* germinan sin ningún pretratamiento en un medio con glucosa como fuente de carbono; en estas condiciones se puede observar un aumento del contenido de cAMP y de la actividad de trehalasa (159). La germinación de blastosporas de *Candida albicans* está acompañada por un aumento en los niveles de cAMP (148). En *Blastocladiella emersonii* los niveles de cAMP aumentan durante la germinación de las zoosporas (149) y la germinación se puede inducir por cAMP o inhibidores de la fosfodiesterasa (150). Todos estos datos sugieren que, a pesar de ser transiente, el incremento de cAMP induce la germinación de esas esporas via la fosforilación de proteínas celulares, y el cAMP sería la señal que controla la liberación del estado durmiente de las esporas (144).

Otra forma más compleja de diferenciación es el dimorfismo micelio-levadura en hongos, que se describe como un proceso de interconversión entre formas levadura y formas miceliales o filamentosas; más adelante es discutido en mas profundidad este proceso para *Mucor*.

DIMORFISMO EN *Mucor rouxii*.

El hongo *M.rouxii* pertenece a la clase Zigomicetes, orden Mucorales. Las especies de *Mucor* tienen las propiedades típicas de otros Zigomicetes,

pero poseen una característica, la cual hace a muchas pero no a todas las especies de *Mucor* distintas de otros Zigomicetes. Esta propiedad es el dimorfismo. Aunque todas las especies de *Mucor* presentan una variedad de morfologías diferentes, dadas por la producción de artrosporas, esporangiosporas y zigosporas, sólo aquellas que pueden crecer en forma de largas hifas o con un crecimiento multipolar esférico como células levaduriformes son las denominadas dimórficas.

La zigospora es el resultado de la reproducción sexual, formada por la fusión de hifas homotálicas o heterotálicas. Las artrosporas surgen como respuesta adaptativa, se forman después de cesar el crecimiento logarítmico o en respuesta a condiciones nutricionales o ambientales desfavorables. Se forman por liberación de los extremos de las hifas, los cuales se septaron y engrosaron su pared. Finalmente las esporangiosporas surgen de estructuras denominadas esporangióforos que se forman en las terminaciones de las hifas y sólo cuando crece en medio sólido y bajo condiciones aeróbicas.

Estas esporangiosporas son característicamente elipsoides, uninucleadas, con una pared externa muy diferente de la de la célula vegetativa tanto química como morfológicamente. Está relativamente enriquecida en proteínas y lípidos, y contiene grandes cantidades de glucanos y melanina, los cuales están completamente ausentes en las paredes de las formas hifas o levaduras. A su vez los niveles de quitina, quitosano, ácido glucurónico y fosfato son mucho menores en las esporas que en las células vegetativas. Estas esporangiosporas pueden crecer como un micelio cenocítico filamentoso o bien como células

levaduriformes, y la dirección morfológica precisa dependerá de las condiciones nutricionales y gaseosas del ambiente.

Independientemente de si las esporas se van a desarrollar como hifas o levaduras, tienen primero un período común de crecimiento esférico. Este crecimiento no es el resultado del mero aumento de volumen por hidratación sino que es debido a crecimiento logarítmico en el que hay síntesis de macromoléculas. El tipo y cantidad de estas macromoléculas parece ser crítico ya que podrían determinar o dirigir el tipo de morfología. Durante el crecimiento esférico se sintetiza pared por debajo de la pared existente de la espora. Esta última se fragmenta y se adhiere a la pared nueva. Luego emergerán yemas o tubos germinativos, dependiendo de las condiciones en que está creciendo. Después de esta emergencia la pared es uniformemente depositada en la forma levadura o localizada apicalmente en las hifas.

Las hifas surgen de las células esféricas en forma de cortas proyecciones denominadas tubos germinativos; a partir de éstos y por crecimiento apical, se desarrolla una estructura multinucleada no septada tubular conocida como hifa cenocítica. El crecimiento de la hifa es únicamente por la punta, es el único sitio donde se sintetiza la pared celular, y es altamente susceptible a la ruptura inducida osmoticamente.

Las levaduras de *Mucor* son células multinucleadas esféricas que crecen y se propagan por medio de gemación de yemas. Estas yemas parecen originarse en sitios al azar sobre la superficie de la célula madre.

Las especies dimórficas de *Mucor* no son todas iguales en su respuesta morfológica al ambiente, sin embargo se pueden hacer dos generalizaciones: 1) las hexosas fermentables son siempre necesarias para el crecimiento en forma de levadura (151,152) y 2) la anaerobiosis favorece el crecimiento en forma de levadura (151,152). Ya sea a partir de esporangiosporas, artrosporas o células vegetativas en medio líquido o sólido de crecimiento un dado conjunto de condiciones usualmente producen una misma respuesta morfológica (151).

Se ha podido determinar que el dimorfismo surge de una interacción compleja de factores ambientales, nutricionales, metabólicos y enzimáticos, estableciéndose una verdadera correlación entre la morfogénesis y las fuentes de carbono (hexosas), dióxido de carbono y oxígeno, poliaminas y síntesis de lípidos. Sin embargo se ha llegado a correlacionar sin lugar a dudas al cAMP con el dimorfismo. Por ejemplo células levaduriformes crecidas en presencia de CO₂ contienen altos niveles de cAMP en contraste con las hifas aeróbicas en las cuales los niveles de este nucleótido son bajos (153). Se ha visto además que la adición de cAMP a cultivos aeróbicos de *M.rouxii*, conteniendo azúcares fermentables, inhibía el crecimiento apical (154). Cuando esporangiosporas de *M.rouxii* germinan aeróbicamente en presencia de 0.15 mM de dibutilil-cAMP en el medio de cultivo, las células no emiten tubos germinativos y crecen en forma isodiamétrica sin impedirse el crecimiento general (155).

También las enzimas relacionadas con el metabolismo del cAMP han sido caracterizadas en *M.rouxii* donde se determinó que la actividad de la fosfodiesterasa de cAMP correlaciona con los niveles de cAMP medidos siendo

de cuatro a seis veces mayor en hifas que en levaduras; la adenilato ciclasa en contraste permanece en los mismos niveles en ambas morfologías (154,156).

En *M.racemosus* (157), *M.mucedo* (158), *M.genevensis* (158), *M.rouxii* (159,160), se midieron los niveles de cAMP durante la germinación de esporangiosporas. Todos los investigadores encontraron que este nucleótido aumenta rápidamente y sustancialmente durante el período de crecimiento esférico de las esporas. En *M.rouxii* se determinó que se alcanzan los niveles máximos durante los primeros minutos , cuando las esporas están en un medio con glucosa (160). Antes de la emergencia del tubo germinativo la concentración del nucleótido cae rápidamente y se mantiene bajo durante el crecimiento de la hifa (153).

OBJETIVO

En el sistema de transducción de señales por cAMP el componente principal de la cascada es la PKA, la cual media las acciones de ese nucleótido cíclico por fosforilación. Nuestro laboratorio tiene como objetivo general estudiar en detalle este mecanismo de transducción de señales y uno de los sistemas utilizados para este estudio es el hongo dimórfico *Mucor rouxii*, en el cual ya se ha caracterizado desde el punto de vista bioquímico a la PKA y también la fisiología del hongo durante su germinación. Se ha demostrado en *M. rouxii* que análogos de cAMP tienen un efecto sobre la morfología de las esporangiosporas en crecimiento aeróbico, impidiendo el crecimiento polarizado de las hifas (155). Estos resultados junto con la descripción de los niveles de cAMP que aumentan inmediatamente de iniciada la germinación en *M. rouxii* (160) así como en otros hongos y levaduras, hicieron pensar que la PKA podía estar involucrada en los estadios tempranos de la germinación.

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido estudiar la regulación de la PKA durante la germinación aeróbica del hongo y comenzar la búsqueda de sustratos endógenos de esta enzima.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

1.1- ORGANISMO UTILIZADO

La cepa de *M.rouxii* utilizada, es la cepa NRRL 1894, obtenida originalmente por el Dr. W.C.Hesseltine y cedida a nuestro laboratorio por el Dr. Roger Storck.

1.2- OBTENCIÓN DE ESPORAS Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA

El mantenimiento de la cepa y la obtención de las esporas usadas para el cultivo del hongo, fueron hechos de acuerdo a lo descrito por Haidle y Stork (161), en agar-jugo de tomate .

1.3- CULTIVOS

1.3.1- Preparación de cultivos para la purificación parcial de PKA

Los inóculos fueron de 5×10^5 esporas por ml en medio YPG(162), con 3% de glucosa como fuente de carbono. Los cultivos fueron crecidos a 28 °C, con agitación continua. Una preparación típica comprende 500 ml de medio de

cultivo en Erlenmeyers de 2 litros. Luego de 14-16 hs de crecimiento (fase logarítmica), los cultivos fueron cosechados por filtración a través de papel Whatman N° 1, lavados exhaustivamente con agua destilada fría y molidos con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino que fue procesado inmediatamente y conservado a -70°C hasta el momento de ser usado. Se obtuvieron en general, 5 gr de micelio a partir de 500 ml de medio.

1.3.2- Preparación de cultivos para la medición de actividad enzimática durante la germinación

Se crecieron 10⁶ esporas por ml de medio YPG, con 3% de glucosa a 28°C y con agitación continua. Muestras de cultivo correspondiendo aproximadamente al mismo peso húmedo fueron tomadas a distintos tiempos de crecimiento, desde 30 min hasta 7 hs. El tiempo cero(0) correspondió a una cantidad equivalente de esporas tomadas directamente de la solución stock en agua destilada estéril.

Los cultivos fueron filtrados utilizando nitrocelulosa de 0.45 µm (Whatman). Los volúmenes de medio típicamente filtrados fueron de 500, 400, 250, 100, 100, 50, y 20 ml para 30 min y 1, 3, 4, 5, 6 y 7 hs de germinación respectivamente.

Las células cosechadas fueron guardadas a -70°C hasta su uso.

2- PREPARACIONES DE PKA

2.1- PREPARACIÓN DE HOLOENZIMA

A partir del polvo de micelio se preparó el extracto enzimático de PKA. Todos los pasos que se detallan fueron realizados a 4°C. Este micelio fue extraído con dos volúmenes de buffer GB, con agitación suave durante 20 min. Se centrifugó a 10.000 rpm (15000 \times g) durante 30 min. El sobrenadante (S10) fue llevado a pH=6 y 0.3 M ClNa previo a su sembrado en una columna de fosfocelulosa a una relación de 50 mg de proteína por ml de resina.

Este paso fue incluido para depletar el extracto de Caseína quinasa II (163). El percolado fue dializado contra buffer GB y cromatografiado en una columna de DEAE-Sepharosa a una relación de 20 mg de proteína por ml de resina.

La columna fue eluida con un gradiente continuo de 0 a 0.6 M de ClNa en buffer GB. Las fracciones con actividad de PKA fueron juntadas y precipitadas con sulfato de amonio 80% de saturación. En este paso la enzima fue guardada en alícuotas a -20°C o bien dializada contra buffer GB o cromatografiada por Sephadex G-25 para eliminar el sulfato de amonio y sometida a una ulterior purificación en gradientes de sacarosa.

Alternativamente se usó como fuente de enzima la preparación obtenida hasta la etapa de DEAE-Sepharosa o la obtenida luego del gradiente de sacarosa, según se indica en cada caso.

2.2- PREPARACIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE LA ENZIMA

La preparación de holoenzima destinada a preparar las subunidades de PKA fue obtenida haciendo algunas variaciones al protocolo del punto anterior. El micelio fue extraído con 2 volúmenes de buffer GB, centrifugado para obtener el S10 y éste fue sembrado en una columna DEAE-Sepharosa que se eluyó en forma discontinua con 0.1 M ClNa y 0.4 M ClNa en buffer GB usando 2 volúmenes de buffer por lecho en ambos casos. Este último eluido fue concentrado con sulfato de amonio 80% de saturación, cromatografiado por Sephadex G-25 o dializado contra buffer GB para eliminar la sal.

2.2.1- Preparación de subunidad catalítica

Se siguió el protocolo descrito en (126). La preparación de DEAE desalada fue sembrada en una columna de cAMP-agarosa(0.5-1 ml) (N⁶-cAMP agarosa de Sigma Chemical Co.) equilibrada con buffer GB. La columna fue lavada con 2 volúmenes de buffer GB y la subunidad catalítica eluida con 10 volúmenes de ClNa 0.5 M en buffer GB.

En las fracciones recogidas se midió proteína y actividad quinasas independiente de cAMP, se juntaron aquellas fracciones que tenían alta actividad catalítica y baja concentración de proteína total.

Tipicamente 10 μ l de una preparación de C catalizó la incorporación de 300 pmol de fosfato al kemptido en condiciones estandar de ensayo.

2.2.2- Preparación de subunidad regulatoria

La subunidad regulatoria fue purificada siguiendo el protocolo estandar, descrito en (164).

Una preparación de PKA de DEAE desalada, fue sembrada en una columna de cAMP-agarosa. La columna fue lavada exhaustivamente con 10 volúmenes de buffer GB y con otros 10 vol. de ClNa 2 M en buffer GB. La subunidad R fue eluída luego de incubar la columna toda la noche a 4°C, con cAMP 10 mM en buffer GB y hacer dos lavados con el mismo buffer.

3- PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE CÉLULAS DE DISTINTOS TIEMPOS DE GERMINACIÓN

Los extractos fueron preparados a partir de los cultivos obtenidos en el punto 1.3.2, a los cuales se les agregó 1.2 gr. de perlas de vidrio (460-600 μm de diámetro), 0,6 ml de buffer de extracción y se lo agitó con vortex tres veces durante 1 min a 4°C. El extracto así obtenido fue separado en alícuotas y guardado a -70°C hasta el momento de su uso.

4- ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE PKA

4.1- MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE HOLOENZIMA PARCIALMENTE PURIFICADA

La medición de actividad se hizo usando kemptido como sustrato. La reacción se llevó a cabo en mezclas de 70 μ l conteniendo buffer Tris-ClH 50 mM pH=7.4, 2-mercaptoetanol 2 mM, $MgCl_2$ 10 mM, $[\gamma^{32}P]ATP$ 50 μ M (300-1000 cpm/pmol), kemptido 63 μ M, la enzima y cuando correspondió cAMP 10 μ M.

Una unidad cataliza la incorporación de 1 pmol de fosfato a kemptido en 10 minutos a 30°C.

Luego de incubar 10 min a 30°C las reacciones se detuvieron sembrando 50 μ l en papeles de fosfocelulosa (Whatman P-81) de 2x2 cm, que fueron sumergidos en ácido fosforico 75 mM, y lavados 3 veces, 5min cada vez, con el mismo ácido y una última vez con etanol. Los papeles fueron secados y se determinó la radioactividad en solución centelladora de tolueno (165). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado.

4.2- MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE LAS SUBUNIDADES DE PKA EN EXTRACTOS CRUDOS.

4.2.1- Determinación de subunidad regulatoria

La medición de subunidad R se basó en la capacidad de esta subunidad de unir [³H]cAMP.

Para esto alícuotas de extractos crudos (50-150 µg de proteína total) fueron incubadas con 0.3µM [³H]cAMP (10⁴ cpm/pmol), 0.5 M ClNa en Tris-ClH 15 mM pH=7. Después de 30 min a 30°C se filtraron alícuotas por nitrocelulosa de 0.45 µm. Los filtros fueron lavados con grandes volúmenes de Tris-ClH 15mM pH=7, se secaron y la radioactividad fue contada con solución centelladora de tolueno (166).

4.2.2- Medición de subunidad catalítica

La cantidad de subunidad C fue determinada ensayando su actividad fosfotransferasa, usando también en este caso kemptido como sustrato.

Las muestras ensayadas fueron diluída entre 20 y 40 veces en buffer de dilución .

Para el ensayo se incubó, en un volúmen final de 70 µl, la muestra diluída (0.5-2 µg de proteína total) con una mezcla de incubación conteniendo

50mM fosfato de potasio pH=6.8, kemptido 75 μ M, [γ^{32} P]ATP 0.1 mM (1300 cpm/pmol), EGTA 0.5 mM, EDTA 0.1 mM, 2-mercaptoetanol 1mM, Cl_2Mg 10 mM y con o sin el agregado de cAMP 10 μ M. La reacción fue incubada durante 10 min a 30 °C; alícuotas de esta mezcla de reacción fueron procesadas en papeles de fosfocelulosa como en 4.1. Todos los ensayos fueron hechos por duplicado y se usaron además muestras de tres experimentos independientes en los cuales se utilizaron para la germinación esporas de distintas preparaciones.

4.3- MEDICIÓN DE ACTIVIDAD DE LAS SUBUNIDADES DE PKA EN CÉLULAS PERMEADAS

4.3.1- Preparación de células permeadas.

El procedimiento de permeación fue hecho de acuerdo a lo ya descrito (167). Células ($0.5\text{-}2 \times 10^9$) provenientes de cultivos de distintas horas de germinación, fueron resuspendidas en 1 ml de buffer de permeación. Se les agregó 150 μ l de una mezcla tolueno:etanol (1:3) y se agitó vigorosamente con vortex durante 5 min en forma ininterrumpida. Las células fueron centrifugadas inmediatamente con microcentífuga y lavadas tres veces con el mismo buffer. Estas células así tratadas fueron usadas dentro de la hora de hecho el tratamiento de permeación .

4.3.2- Ensayos de actividad de C y R

Alícuotas conteniendo de $0.8-1.6 \times 10^7$ células fueron usadas para medir actividad de C. Se usó el mismo ensayo que en 4.2.2 pero se incubó durante 5 min a 30 °C. Después de la incubación se agregó albúmina sérica bovina a una concentración final de 10 mg/ml, se hirvió durante 5 min inmediatamente y centrifugó. Alícuotas del sobrenadante fueron sembradas en papeles de fosfocelulosa como ya se describió.

Para medir actividad ligante de cAMP, alícuotas de esporas permeadas fueron incubadas con [^3H]cAMP, en las condiciones estandar de ensayo. Luego de la incubación se procedió como se indicó anteriormente en 4.2.1.

5- ENSAYOS DE AUTOFOSFORILACIÓN

5.1- AUTOFOSFORILACIÓN DE SUBUNIDAD R

Los ensayos de fosforilación endógena fueron hechos con 50 μM [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP (1000cpm/pmol), en ausencia de cAMP y de sustrato exógeno y con o sin adición de subunidad C de *M.rouxii*, purificada como en 2.2.1. Las condiciones estandar de preincubación para la autofosforilación fueron de 4°C y 2 min. Cuando fue necesario, las reacciones fueron detenidas con el agregado

de EDTA a una concentración final de 15 mM. La fuente de enzima fue holoenzima preparada por DEAE-Sepharosa y en algun caso tenía un paso más de purificación a través de una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

5.1.1- Cromatografía en cAMP-agarosa

La cromatografía en cAMP-agarosa de proteínas fosforiladas endogenamente fue realizada utilizando PKA de una preparación de DEAE-Sepharosa, la cual fue incubada 5 min a 30°C en un volúmen final de 140 μ l con 50 μ M de ATP(12×10^6 cpm) y Cl_2Mg 10 mM. La reacción fue detenida con EDTA. Se sembró luego una columna de cAMP-agarosa (N^6cAMP -agarosa de Sigma Chemical Co.. Se dejó que la muestra se uniera durante 1 h a 4°C, luego la columna fue lavada sucesivamene con buffer GB ,con ClNa 2 M en buffer GB y con cAMP 10 mM en buffer GB como ya se explicó en 2.2.2.

6- CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTES DE SACAROSA

Se prepararon gradientes lineales 5-20% de sacarosa, buffer de extracción sin ClNa , superponiendo siete capas de 650 μ l cada una; se dejaron a temperatura ambiente durante dos horas, se enfriaron a 4°C y se sembraron inmediatamente con extractos correspondientes a distintas horas de comenzada la germinación. Las muestras sembradas contenían entre 300 y 600 μ g de

proteína , en un volumen de 200 μ l. En otros casos las muestras sembradas correspondían a enzima parcialmente purificada por DEAE-Sepharosa. Se centrifugaron durante 15 hs a 4°C en un rotor SW 55 Ti Beckman, a 35000 rpm.

Los gradientes se fraccionaron desde el fondo hasta la superficie haciendo sifón en 22 fracciones de aproximadamente 200 μ l; alícuotas de estas fracciones fueron ensayadas para medir actividad de PKA en presencia de 10 μ M de cAMP y para actividad ligante de cAMP.

Se usaron como marcadores catalasa (11.3 S), peroxidasa (3.5 S) y citocromo c (1.7 S).

7- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE cAMP

A distintos tiempos después de comenzada la germinación se filtraron por nitrocelulosa alícuotas (aproximadamente 20 mg de peso húmedo) de cultivos de 1×10^6 esporas/ml.

Las membranas de nitrocelulosa fueron sumergidas inmediatamente en 0.1 M ClH, y fueron sometidas a tres ciclos de congelamiento y descongelamiento en N₂ líquido. Se centrifugó a 10000 x g , 30 segundos y el sobrenadante se guardó a -70°C en alícuotas .

La cantidad de cAMP fue medida por radioinmunoensayo, usando [¹²⁵I]cAMP (cedido gentilmente por el Dr. Eduardo Charreau y un anticuerpo policlonal anti-cAMP (Chemicon International Inc) (165'). El cAMP unido al

anticuerpo se separó del nucleótido libre, precipitando el primero con etanol 95% a temperatura ambiente durante 5 min.

La curva estandar se confeccionó con cAMP variando la concentración entre 19 fmoles y 5000 fmoles.

8- ENSAYOS PARA DETERMINAR SUSTRATOS ENDÓGENOS

8.1- PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA WESTERN-BLOT REVELADOS CON ANTI-FOSFOSERINA

Se prepararon extractos crudos de células de distintas horas de germinación. Estos extractos se prepararon como ya se indicó en 3, con la salvedad que se uso buffer de extracción suplementado con inhibidores de fosfatasas (vanadato 0.15 mM, glicerofosfato 75 mM). A estos extractos inmediatamente después de prepararlos se les agregó buffer de siembra y se hirvieron 5 min a 100°C. Las muestras fueron luego corridas en SDS-PAGE 7% y 14% y transferidos a nitrocelulosa. Para el revelado se usó el anticuerpo monoclonal anti-fosfoserina diluído 1:100 (de Sigma Chemical Co.).

8.2- FOSFORILACIÓN DE SUSTRATOS ENDÓGENOS

8.2.1- Fosforilación en extractos libres de células utilizando subunidad C

Extractos crudos de esporas preparados como ya se indicó en 3, fueron sembrados en una columna de DEAE-Sepharosa que fue eluída con dos concentraciones de ClNa, obteniéndose las fracciones P(percolado), 0.2 M de ClNa y 0.4 M ClNa.

Alicuotas de estas fracciones fueron incubadas con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP 50 μM (1000 cpm/pmol), Tris-ClH 50 mM y Cl_2Mg 10 mM, en presencia o no de subunidad catalítica de *M.rouxii* o de corazón bovino ,durante 10 min a 30°C. Luego se les agregó el buffer de siembra e hirvió durante 5 min; finalmente fueron corridas en SDS-PGE.

8.2.2- Fosforilación en esporas permeadas

Esporas de *M.rouxii* fueron permeadas con la metodología ya descripta. Las esporas fueros incubadas con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP 100 μM (1000 cpm/pmol), Tris-ClH 50 mM, Cl_2Mg 10 mM, en presencia y ausencia de cAMP10 μM . En algunos casos se hizo una preincubación con ATP 100 μM y Cl_2Mg 10 mM y con o sin glucosa 3% durante 5 min a 30 °C y luego se incubó con el [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (1000 cpm/pmol).

9- MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

9.1- PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA SUBUNIDAD R

Los anticuerpos policlonales contra la subunidad R fueron preparados inyectando conejos con nitrocelulosa, conteniendo la proteína purificada , solubilizada con dimetilsulfóxido.

Preparaciones de la subunidad R purificada como se indicó en 2.2.2 se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. La zona correspondiente a 55-70 kDa fue cortada, después de la transferencia y solubilizada usando la mínima cantidad de DMSO (168,169). Esta suspensión se mezcló con adyuvante completo de Freund y se aplicó con múltiples inyecciones intradérmicas en el lomo del conejo. Se inyectó por dosis entre 50 y 80 µg de proteína, se realizaron 3 dosis, los días 1,20 y 40. Se hicieron sangrías 7 días después de cada dosis. El suero preinmune del mismo conejo no reconoció ninguna proteína en extractos de *M.rouxii*. El título en que se usó el anticuerpo está indicado en cada caso.

9.2- DETERMINACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO

Alícuotas de subunidad R purificada fueron incubadas con [³H]cAMP para obtener el complejo [³H]cAMP₄.R₂ como fue descrito (128). Estos complejos

fueron sembrados en un gel de poliacrilamida 5% no desnaturizante. La mitad del gel fue usada para hacer Western-blot y la otra mitad fue cortada en rebanadas de 2 mm de ancho. Estas rodajas fueron disueltas en H₂O₂ 30 % durante 30 min a 100°C y se midió luego la radioactividad a cada fracción usando mezcla de centelleo con Arkopal N-100.

9.3- WESTERN-BLOT

9.3.1- Transferencia

Después de hacer la electroforesis de los geles de poliacrilamida, se los sometió a electrotransferencia, con buffer Tris-HCl 25mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3. Las condiciones de transferencia fueron 30 min a 10 volts y 1h 30 min a 45 volts.

9.3.2- Revelado

a) Tinción para proteínas

Se llevó a cabo con una solución de Amido Black 0.2% en metanol-acético-agua (45:10:45) durante 5 minutos, luego se destiñó con la solución de metanol:acético:agua (45:10:45).

b) Revelado con anticuerpos

Las membranas de nitrocelulosa transferidas se incubaron durante 60 min con la solución de bloqueo a temperatura ambiente y con agitación continua. Luego se reemplazó esta solución por el anticuerpo diluido en solución de bloqueo. Se incubó durante 1h a temperatura ambiente con agitación continua. Cuando se cumplió con el tiempo de incubación se procedió a lavar 3 veces con solución de bloqueo y dos veces con TBS. Finalmente se reveló en algunos casos con 4-Cl-1-Naftol y H_2O_2 como sustratos y en otros con el sistema de revelado de quimioluminiscencia (Dupont-NEN).

Este es el protocolo básico, las variaciones que incluyen tipo y dilución de cada anticuerpo se especifican en los resultados y las leyendas de las figuras.

10- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Tanto para las electroforesis desnaturalizantes como para las nativas, se usaron mini-geles de poliacrilamida 7%, 10%, 12% o 14% según el caso y se siguió la metodología descrita por Laemmli (171). Las muestras fueron mezcladas con un volumen adecuado de buffer de siembra y hervidas a 100°C durante 5 min. Las corridas se hicieron con voltaje constante de 100-150 voltios, a temperatura ambiente. Cuando los geles no fueron transferidos a nitrocelulosa fueron teñidos para visualizar las proteínas con la solución teñidora de

Coomasie-Blue y destañados con la solución decolorante, luego fueron secados al vacío y por calor. Cuando las muestras corridas habían sido sometidas a distintos métodos de fosforilación, la radioactividad incorporada en las proteínas fue detectada exponiendo los geles previamente secos a autorradiografía, usando una película Agfa Curix RP-1 a -70°C, utilizando pantalla amplificadora.

11- OTRAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

11.1- PEROXIDASA y CATALASA

Se siguieron las técnicas descritas en el manual de Worthington (172).

12- MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La proteína soluble fue dosada por el método de Bradford (173), usando seroalbúmina bovina como proteína patrón.

La proteína total se midió por el método de Lowry (174), después de haber sido solubilizada con tratamiento alcalino. También se usó seroalbúmina bovina como proteína patrón.

13- MEDICIÓN DE LA RADIOACTIVIDAD

13.1- RADIACIÓN β

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

La mezcla centelladora de tolueno contiene 0.1 gr de dimetil POPOP[1,4 bis 2(4-metil-5-feniloxazolilbenzeno)] y 4 gr de PPO (2,5-difeniloxazol) en un litro de tolueno.

13.2- RADIACIÓN γ

Se utilizó un contador γ de pozo, en ausencia de solución centelladora.

14- BUFFERS Y SOLUCIONES

BUFFER GB:

Tris-ClH 10 mM, pH=7.4
2-mercaptoetanol 10 mM
EDTA 1 mM
EGTA 1mM
p-metil-sulfonil-fluoruro 0.5 mM

BUFFER DE EXTRACCIÓN:

K₂HPO₄-KH₂PO₄ 50 mM, pH=6.8
EDTA 5 mM
EGTA 3 mM
NaCl 120 mM
2-mercaptoetanol 10 mM
p-metil-sulfonil-fluoruro 1 mM
antipaina 3 μ g/ml
benzamidina 1 mM

BUFFER DE DILUCIÓN:

K_2HPO_4 - KH_2PO_4 50 mM, pH=6.8
EDTA 5 mM
EGTA 3 mM
2-mercaptoetanol 10 mM
BSA 0.9 mg/ml

BUFFER DE PERMEACIÓN:

Tris-ClH 50 mM, pH=7.4
EGTA 1mM
2-mercaptoetanol 10 mM
EDTA 3 mM
bezamidina 1 mM
PMSF 1 mM

BUFFER TBS:

Tris-ClH 50 mM, pH=7.4
ClNa 150 mM

BUFFER TBS-TWEEN

TBS/tween 20 0.1 %

SOLUCIÓN DE BLOQUEO:

TBS/tween
leche descremada en polvo 5%

SOLUCIÓN TEÑIDORA:

Coomasie-Blue R 0.1%
ácido acético 40%
metanol 20%

SOLUCIÓN DESTEÑIDORA:

ácido acético 40 %
metanol 20%

RESULTADOS

1- REGULACIÓN DE LA PKA DURANTE LA GERMINACIÓN

Con la idea de estudiar la regulación de la PKA *in vivo* durante la germinación aeróbica de *M. rouxii*, se midieron los niveles de la subunidad reguladora (R), la subunidad catalítica (C) y del cAMP, durante los estadios tempranos de este proceso.

Antes de pasar a explicar estos resultados debemos hacer algunas consideraciones acerca de la metodología empleada en los experimentos, para una mayor comprensión de los mismos.

Para medir en forma adecuada la actividad específica de la subunidad catalítica de PKA en extractos de células, se debieron hacer una serie de experimentos previos que permitieron determinar las condiciones de ensayo para medir actividad de C en condiciones lineales.

En estas condiciones, la actividad quinasa fue inversamente proporcional a la dilución enzimática, de esta manera nos aseguramos que el ensayo no fuera afectado por inhibidores y nos permitió comparar las actividades de distintos extractos.

Para extractos de esporangiosporas se determinó que no había proporcionalidad entre la alícuota de homogenato ensayado y la actividad quinasa, por encima de los 2 μg de proteína total. Se eligió entonces para medir actividad de PKA, en extractos de células provenientes de distintas horas de germinación, una cantidad de proteína total que varió entre 0.5 y 2 μg . Dado que en esa

cantidad de proteína la cantidad de enzima es sumamente baja se debió utilizar una alta actividad específica de [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (aproximadamente 1000 cpm/pmol).

La actividad enzimática fue siempre medida en ausencia y presencia de cAMP 10 μM . Sin embargo creemos que esta relación obtenida, es decir la actividad en ausencia de cAMP dividida por la actividad en presencia de cAMP, no refleja el grado de activación endógena de esta enzima (afirmación que concuerda con la opinión de Døskeland (175)). Esto se debe a que si la dilución hecha a la muestra para hacer el ensayo en condiciones de linealidad es demasiado alta, tal que la concentración final de la enzima este en el orden de su K_d , se puede desplazar el equilibrio entre la forma holoenzima y sus subunidades hacia la disociación. Es decir que a concentraciones bajas de holoenzima las subunidades de PKA se disocian en ausencia de cAMP (106). De los datos de actividad de unión de cAMP (ver mas adelante) se puede estimar una concentración de holoenzima del orden de subnanomolar en extractos diluidos a 0.05 mg/ml, de las muestras obtenidas a los distintos tiempos de germinación. Si bien no conocemos la K_d para la interacción R-C en *M.rouxii*, una concentración subnanomolar como la encontrada, es del orden de la K_d para eucariotas superiores (0.1 nM), (106) y muy inferior a la IC_{50} publicada para la inhibición de C de *Saccharomyces cerevisiae* por su R homóloga que es de 40 nM (176). De hecho, extractos crudos de *S.cerevisiae* a una concentración de 0.1 mg/ml, con una concentración de holoenzima de 0.2 nM presenta actividad de PKA completamente independiente de cAMP (Zaremborg, V., comunicación personal).

La actividad específica de la subunidad regulatoria de PKA fue medida por la capacidad de unión a [^3H]cAMP; por lo tanto fue esencial que hubiese intercambio total entre el cAMP endógeno y el [^3H]cAMP agregado (106). Estas condiciones se alcanzaron incubando 30 min. a 30°C. Para detectar si el cAMP endógeno presente en el homogenato podía estar diluyendo el [^3H]cAMP del ensayo y por lo tanto interferir en la determinación de los verdaderos valores de R, se hicieron los ensayos con dos diluciones diferentes de muestra y además con dos concentraciones diferentes de [^3H]cAMP (0.3 y 0.6 μM). Los valores de R así determinados no variaron con la dilución de enzima ni con la concentración de cAMP, sugiriendo que no había interferencia por el cAMP endógeno.

1.1- ACTIVIDAD ESPECÍFICA Y CONCENTRACIÓN DE LAS SUBUNIDADES DE LA PKA DURANTE LA GERMINACIÓN

Las actividades de las subunidades R y C fueron medidas durante la germinación de *M.rouxii*. Para esto se hicieron determinaciones en extractos crudos de esporangiosporas, que se consideraron tiempo 0 (cero), y en extractos obtenidos de células de distintas horas después de comenzada la germinación hasta el momento de emitir el tubo germinativo. Las muestras fueron tomadas a la hora, y a las 3,4,5,6 y 7 hs, de inocular las esporas en el medio de cultivo. El momento en que se inoculan las esporas en el medio de cultivo se considera como inicio de la germinación.

En general las células emitían el tubo germinativo entre las 6 y 7 hs después de comenzada la germinación. Durante este tiempo se considera que el cultivo está bastante sincronizado.

En la figura 7 están representadas las actividades específicas de las subunidades C y R a lo largo de la germinación. Se puede ver que la actividad específica de la subunidad C disminuye en la primer hora aproximadamente tres veces. La subunidad R, sin embargo, se mantiene relativamente constante. Teniendo en cuenta que la proteína total no varía durante esta primer hora de germinación (ver tabla 2), como así tampoco el volumen celular, podemos suponer que la disminución de los niveles de la subunidad C, corresponde a la desaparición de esta actividad por degradación de la subunidad.

Entre 1 y 3 hs las actividades específicas de R y C disminuyen alrededor de cuatro veces, tanto como aumenta la proteína total. Esto sugiere que las subunidades presentes en 1 h se diluyen por el aumento de la proteína total, lo que podría ser una consecuencia de que no haya síntesis neta de ninguna de las dos subunidades porque la velocidad de degradación de ambas sea igual a la velocidad de síntesis, o bien que no haya síntesis ni degradación. De todas maneras hay una disminución de estas subunidades relativa a las proteínas totales.

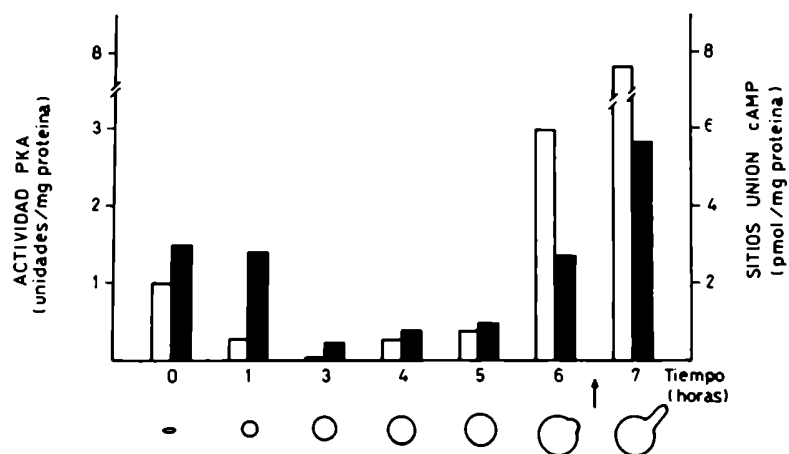


Figura 7.

Actividad específica de las subunidades de PKA durante la germinación.

La actividad de la subunidad C está representada por las barras vacías, la actividad de R por las barras negras. Los valores graficados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos diferentes. El SD es menor que el 10%. La flecha indica el momento de emisión del tubo germinativo.

TIEMPO DE GERMINACION	VOLUMEN μm^3	PROTEINA pg
0	18 ± 2	4
1	20 ± 2	4
3	70 ± 5	15
4	150 ± 10	20
5	350 ± 25	35
6	650 ± 40	106
7	n.d.	225

Tabla 2

Proteína total y volumen por célula durante la germinación

El volumen celular fue calculado para cada estadio del crecimiento como un promedio de los diámetros de las células obtenidos de mediciones en fotografías de preparaciones fijadas. Las células germinadas fueron consideradas como esferas y las esporangiosporas como elipsoides con dos diámetros. La proteína por célula fue calculada a partir de la proteína total de un número conocido de células contadas con un hemacitómetro. n.d, no determinado. El volumen está expresado \pm SE, $n=30$.

A las 4 y 5 hs las actividades específicas de las subunidades son similares a las encontradas a las 3 hs. Dado que la proteína total aumentó dos veces aproximadamente entre esas horas, debió haber síntesis neta de ambas subunidades para mantener los valores similares a lo largo del tiempo. A partir de las 6 hs se puede observar un aumento muy notorio en la actividad específica de ambas subunidades. Entre 6 y 7 hs de germinación el aumento en la proteína total es muy alto, por lo tanto un aumento tan significativo en la actividad específica de ambas subunidades, debe ser la consecuencia de una alta velocidad de síntesis.

Las actividades de C y R fueron expresadas también como concentración, teniendo en cuenta el volumen celular. La concentración de la subunidad R está expresada como concentración de sitios de unión de cAMP y la de la subunidad C en unidades arbitrarias. Como se puede ver en la figura 8 los datos de concentración reflejan lo mismo que los de actividad específica, lo cual es lógico ya que los volúmenes celulares aumentan en proporción al aumento de la proteína total.

También se expresaron las actividades de C y R como niveles totales por célula (10^8 células). En la figura 9 se puede observar que la subunidad R es casi constante durante las primeras 3-4 hs de germinación, sin embargo la subunidad C baja durante la primer hora (observar que la escala del gráfico es logarítmica).

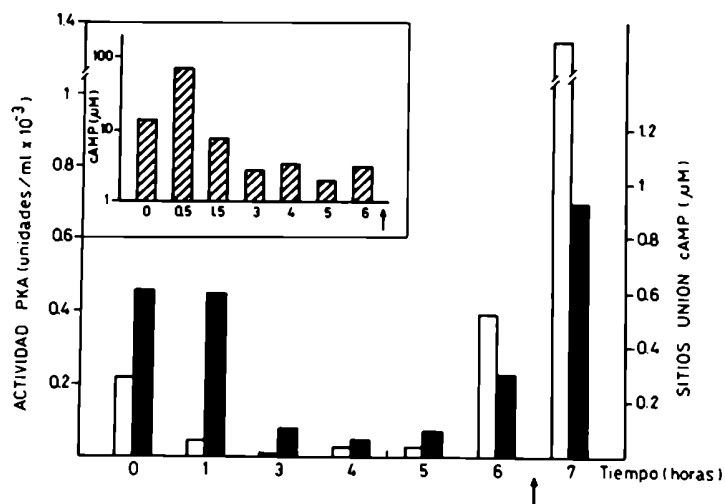


Figura 8

Concentración de las subunidades de PKA y concentración de cAMP durante la germinación.

Las concentraciones de la subunidad C (barras vacías) y de la subunidad R (barras negras), fueron calculadas a partir de las actividades específicas de la subunidades de la figura 7 y los volúmenes celulares de la tabla 2. El gráfico superior muestra las concentraciones de cAMP. La flecha indica el momento de emisión del tubo germinativo.

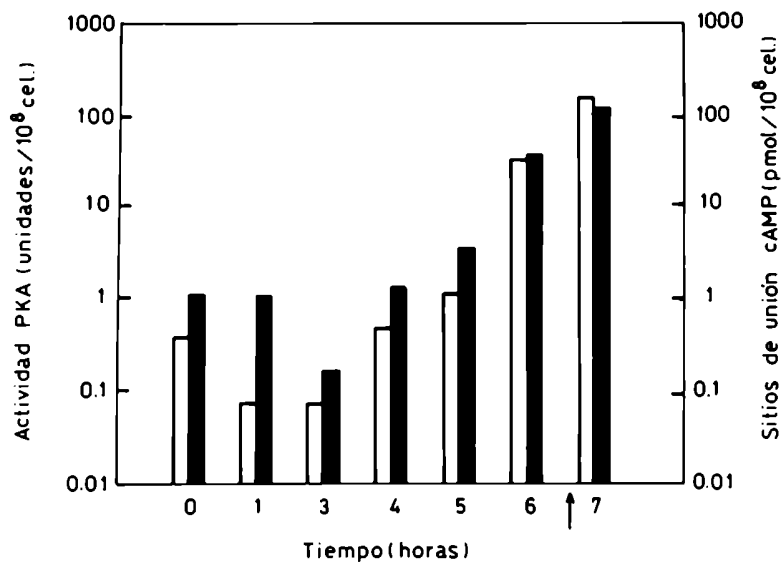


Figura 9

Niveles de las subunidades C y R por célula.

Los niveles de la subunidad C están representados por las barras vacías, y los de la subunidad R por las barras negras; ambos están expresadas como actividad en 10^8 células. La flecha indica el momento de emisión del tubo germinativo.

Esto concuerda con la idea de que C fue degradada durante la primer hora y no así la subunidad R. Si la subunidad R por célula se mantiene constante mientras su actividad específica baja, quiere decir que mientras aumenta la proteína total, no hubo ni síntesis ni degradación de R. En cambio se puede ver que hay un aumento neto tanto en la cantidad de R como de C por célula a partir de las 4 hs.

Por resultados previos de nuestro laboratorio (126,127), sabemos que la relación R/C en una preparación de la holoenzima purificada es de 0.5 pmol cAMP unido/unidad de PKA. Se calculó la relación R/C en esporas, y a las distintas horas después de comenzada la germinación, (figura 10). En esporas esta relación fue 6 veces mayor que la de la holoenzima aislada y a las 7 hs fue sólo 1.5 veces mayor. En esporas por lo tanto, la subunidad R parece estar en gran exceso con respecto a la subunidad C. A partir del dato R/C de 0.5 pmol cAMP/unidad de C para la holoenzima aislada y de las concentraciones de C en unidades arbitrarias, teniendo en cuenta que una molécula de holoenzima une cuatro moléculas de cAMP, se estimó para las 7 hs, que si la actividad de C medida correspondiera a C de la holoenzima, las concentraciones intracelulares serían del orden del décimo de micromolar; coincidente con el orden de las concentraciones descritas para tejidos de mamíferos (177). Hay que resaltar que estas concentraciones son muy altas si se las compara con las concentraciones usadas en los ensayos *in vitro* para la medición de parámetros cinéticos, las cuales suelen ser del orden de nM.

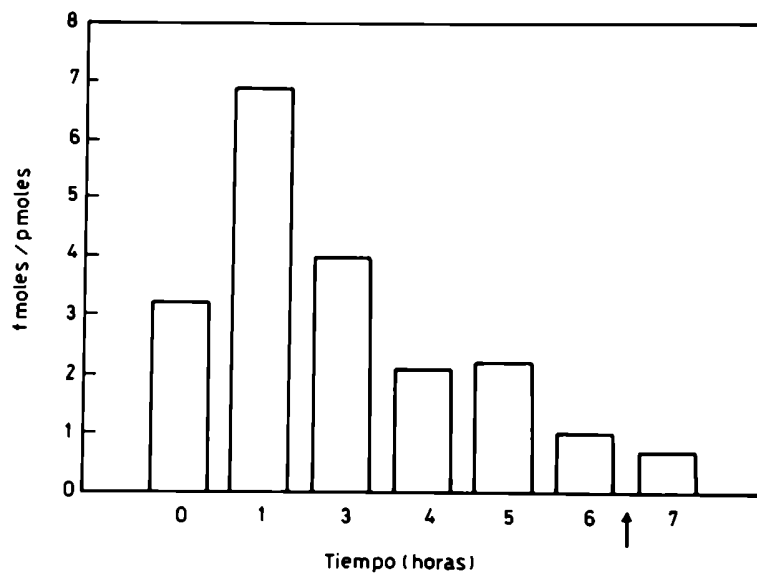


Figura 10.

Relación de actividades de las subunidades R y C.

Las barras representan el cociente de las actividades de la subunidad R y C expresados en fmoles de cAMP unido y pmoles de kemptido fosforilado en 10 min respectivamente.

Si bien por las explicaciones dadas en las consideraciones metodológicas no es correcto tomar las medidas de actividad de PKA en presencia y ausencia de cAMP como un reflejo de la verdadera disociación endógena, se calcularon las relaciones de actividad sin cAMP y con cAMP en los distintos extractos. La relación de actividades -cAMP/+ cAMP calculadas para las distintas horas de germinación exceptuando tiempo 0, varían entre 0.3 y 0.5 .

Fue muy llamativo que en esporas el valor obtenido de esta relación fuese igual a 1; sin embargo la actividad medida si bien es independiente de cAMP, es dependiente de kemptido, sustrato que se sabe es altamente específico para la fosforilación por PKA.

Existen antecedentes de medición de actividad de unión de cAMP durante la germinación de *M.genevensis*, *M.mucedo*, *M.racemosus* (178, 158), que están de acuerdo con nuestros resultados. En estos tres hongos se determinó, utilizando [³H]cAMP o marcación por fotoafinidad con [³²P]-8-azido-cAMP como ligandos, que los mayores valores de actividad de unión de cAMP se encontraban en esporas. Una vez que las esporas habían sido inoculadas en el medio de cultivo, los niveles de esta actividad disminuían hasta alcanzar un mínimo, para luego aumentar antes de la emisión del tubo germinativo.

1.2- CONCENTRACIÓN DE cAMP DURANTE LA GERMINACIÓN

Se ha visto que en las esporangiosporas de *M. rouxii*, crecidas en un medio de cultivo conteniendo glucosa, se produce un incremento transiente en

los niveles de cAMP después de iniciada la germinación (158 160). Este fenómeno se ha observado también en otras especies de hongos (158, 179, 180,181).

Por lo tanto con el objetivo de relacionar las variaciones en los niveles de PKA con los niveles de cAMP, se midieron los niveles de este nucleótido cíclico durante la germinación de esporangiosporas a los mismos tiempos en que se midió actividad de PKA.

Los valores obtenidos están graficados en la figura 8 (gráfico inserto). Se puede ver que después de una incubación de 30 min la concentración de cAMP aumentó de 10 μM a 90 μM . Luego la concentración de este nucleótido disminuyó y no volvió a aumentar.

Podemos ver que alrededor del tiempo en que se produce el pico de cAMP, la actividad catalítica de PKA disminuye. Podemos suponer que la holoenzima se pudo haber dissociado por el incremento de cAMP y que la subunidad C libre fue posteriormente inactivada por degradación proteolítica.

El pico de cAMP fue detectado a los 30 min, pero no sabemos verdaderamente entre 0 y 30 min el momento exacto en que se produce. Quizás los niveles medidos de este nucleótido a los 30 min no correspondan a los niveles máximos alcanzados.

Tampoco sabemos entre 0 y 1 h en qué momento comenzaría la proteólisis de C. A pesar de esto podemos correlacionar aumento de cAMP con activación de PKA y posterior depleción regulada (proceso conocido en inglés como down-regulation) de la subunidad C, que ya ha sido descrito en varios

sistemas (122,183-184). Døskeland ha sugerido(122), como la explicación más simple para este proceso, que la subunidad C podría ser más rápidamente degradada por una actividad proteasa ya existente en la célula que la C unida a la subunidad R en la holoenzima. Apoyando esta idea fue descrita (182) también una proteasa asociada a membrana que degrada específicamente C libre y no cuando está asociada a R. De todas maneras no se puede descartar la posibilidad que los niveles altos de cAMP activen algún sistema proteolítico que actúe sobre la subunidad C libre.

En este fenómeno de depleción de C, la subunidad C disminuye, R permanece constante y por lo tanto la relación R/C aumenta. De consideraciones cinéticas hechas por Døskeland (122) surge que cuando R es constante y C disminuye, no sólo hay menos C disponible para la activación, sino que esa cantidad de C remanente requiere mayores concentraciones de cAMP para su activación. Además habría más R disponible para actuar como un reservorio para el cAMP cuando C disminuye, haciendo más difícil su disociación (122).

1.3- ANÁLISIS DE EXTRACTOS DE CULTIVOS OBTENIDOS A LO LARGO DE LA GERMINACIÓN EN GRADIENTES DE SACAROSA

1.3.1- Extractos de esporas

Fue muy llamativa la alta relación R/C encontrada en esporas, como así también su aparente independencia de cAMP, la cual no es tan pronunciada a la

hora de iniciada la germinación. Nuestro interés fue saber cómo era la holoenzima en esporas y si la alta relación R/C correspondía en realidad a un exceso de subunidad R libre. Dado que en nuestro laboratorio se conocía bien el comportamiento de la holoenzima y sus subunidades en ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, se sometieron a esta técnica alícuotas de extractos de distintos tiempos de germinación, conteniendo la misma cantidad de proteína.

Una vez centrifugados los gradientes fueron fraccionados y a cada fracción recogida se le determinó actividad de PKA en presencia de cAMP y actividad de subunidad R. Los resultados están graficados en la figura 11. En el primer panel de la figura está el perfil correspondiente a esporangiosporas. Vemos que la principal actividad de PKA corresponde a una enzima de 5.5 S; este pico tiene un hombro al que le corresponde un coeficiente de sedimentación mayor. Hay actividad de unión de cAMP acompañando el pico de PKA, pero la mayor actividad se encuentra no asociada a la actividad catalítica y tiene un coeficiente de sedimentación de 2.7 S. Esta PKA de menor S podría corresponder a una forma diferente de holoenzima.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se vió que en un extracto de *M.rouxii* en fase logarítmica de crecimiento existe una especie de holoenzima de PKA de 8.8 S (128), que por proteólisis suave con tripsina da origen a otra especie denominada R'C (127) dimérica la cual conserva los dos sitios de unión de cAMP. Esta especie por disociación produjo una subunidad R' de 2.5 S y una subunidad C muy similar a la nativa. La misma especie R'C se puede detectar en células que se encuentran en fase estacionaria de crecimiento (127), estadio en el cual se produce proteólisis endógena por autólisis.

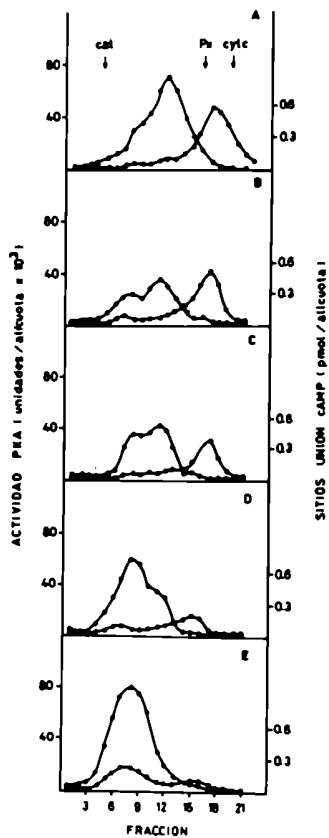


Figura 11.

Actividad de PKA y de unión de cAMP presentes a lo largo de la germinación visualizadas en gradientes de sedimentación de sacarosa.

Muestras de extractos de células crecidas 0 (A), 1 (B), 4 (C), 5 (D) y 7 (E) hs conteniendo 300 μg de proteína, fueron sembrados en los gradientes 5-20% de sacarosa y fueron centrifugados 15 hs a 35000 rpm en un rotor Beckman SW 55Ti. Aliquotas de cada fracción de los gradientes fueron ensayadas para medir actividad de PKA en presencia de cAMP (\leftarrow) y actividad de unión de cAMP (\rightarrow).

El perfil obtenido en el gradiente del extracto de esporas fue siempre reproducible aún usando esporas de distintas cosechas que fueron almacenadas por diferentes períodos de tiempo. Esto sugirió que esta especie de holoenzima no se formó por proteólisis durante la extracción ni durante el almacenamiento, sino que es una especie propia de la spora. Es muy probable entonces que la holoenzima de 5.5 S y la subunidad R de 2.7 S, que denominaremos R''C y R' se formen por proteólisis endógena de la holoenzima nativa y de R₂ durante el proceso de esporulación. Denominamos R''C y R' ya que no sabemos si la R en la especie de 5.5 S es la misma que la R de 2.7 S.

La holoenzima de 5.5 S posee actividad dependiente de cAMP siendo la relación de actividades sin y con cAMP del orden de 0.2. Es probable entonces que la falta de dependencia por el cAMP encontrada en extractos crudos de esporas sea producto de la dilución hecha al mismo en el ensayo de actividad.

Para determinar si la especie de 2.7 S encontrada en esporas conservaba la capacidad de inhibir a la subunidad catalítica, se procedió a hacer un ensayo de inhibición de la subunidad C. Para esto se obtuvo R de 2.7 S a partir de un gradiente de sacarosa de un extracto de esporas. Se preparó subunidad catalítica a partir de un micelio de 13 hs de crecimiento según se indica en materiales y métodos. Se enfrentaron distintas cantidades de R con una cantidad fija de C (0.6 unidades), en presencia y ausencia de cAMP. Las relaciones R/C elegidas rondaron el valor de esta relación para una holoenzima purificada. En la figura 12 están representadas las actividades de C, expresadas en porcentaje considerando 100% a la actividad de C correspondiente a 0.6 unidades en ausencia de

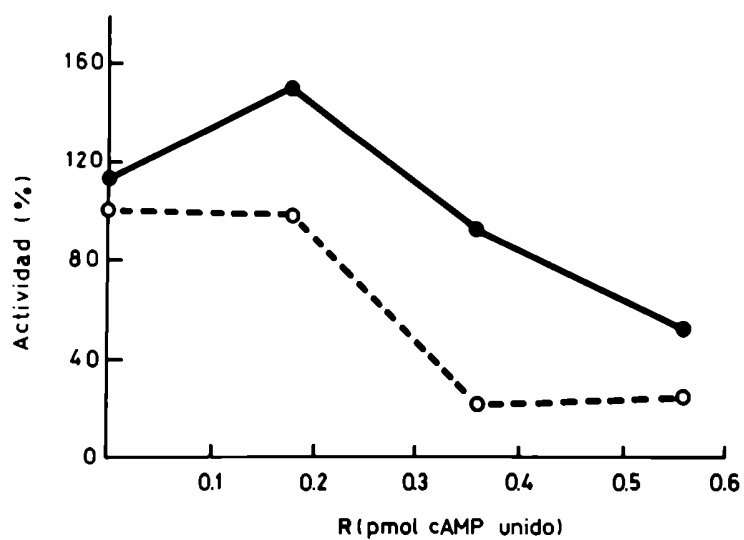


Figura 12.

Inhibición de la actividad de la subunidad C en presencia de la subunidad R" de 2.7 S.

En el gráfico están representados las actividades de C expresadas como porcentaje. Se considera 100% la actividad de C correspondiente a 0.6 U en ausencia de subunidad R .

La subunidad R" de 2.7 S proviene de una purificación por centrifugación en gradiente de sacarosa. Se enfrentaron 0.6 U de C con cantidades variables de R equivalentes a 0.18, 0.36 y 0.56 de capacidad de unión de cAMP, en presencia (—●—) y en ausencia (---○---) de cAMP.

subunidad R. Como se puede ver a mayor cantidad de subunidad R agregada mayor inhibición. En presencia de cAMP la inhibición lograda fue menor que cuando se hizo el ensayo en ausencia de este nucleótido, lo cual es lógico si se tiene en cuenta que la inhibición de C por la subunidad R es revertida en presencia de cAMP. En este caso si bien no se logró reversión total se consiguió que haya menos inhibición. En ausencia de cAMP se logró una inhibición del 79.4% y 75.5%, como inhibiciones máximas. La alícuota correspondiente a la subunidad C en presencia de cAMP presenta actividad ligeramente activable por este nucleótido. Esto nos indica que en la fracción correspondiente a la subunidad C, ésta no es la única especie presente sino que también hay holoenzima. En presencia de cAMP cuando se juntan las alícuotas de R y de C (segundo punto), hay una estimulación de la actividad en comparación con el punto sin alícuota de R. Este aumento en la actividad lo entendemos como consecuencia de una activación mayor de la holoenzima presente en la fracción de C; esta activación mayor sería producida por distintos componentes o sustratos presentes en la fracción de R, que favorecerían la disociación de la enzima. Entendemos que la activación lograda de la holoenzima presente en la fracción de C con cAMP, no sería la máxima posible para esa enzima y que en presencia de la alícuota de la fracción de R por efecto de algún componente que aporta esta fracción, junto con cAMP lograría una activación mayor, la cual tampoco tendría que ser la máxima posible e incluso puede estar inhibida por la subunidad R agregada. Los resultados del experimento

control con cAMP no nos sorprenden , ya que en nuestro laboratorio se sabe que la activación de la PKA de *M. rouxii* es muy compleja y depende de otros factores además del cAMP (130 y Zaremborg, V. comunicación personal). Por otro lado como hemos dicho por consideraciones cinéticas, se puede predecir que a mayor relación R/C se logra menor activación con la misma concentración de cAMP. De estos resultados concluimos que esta especie proteolizada de subunidad R puede inhibir C.

La subunidad R' puede unir cAMP lo que indica que aún conserva los sitios de unión al nucleótido cíclico y como ya fue mencionado también puede unir C ya que inhibe la actividad de esta subunidad. Por lo tanto y de acuerdo con el valor de S calculado para esta especie la estructura mas probable es la de un monómero derivado del dímero R₂ nativo, en el cual la proteólisis haya ocurrido del lado amino terminal de la molécula, de manera de alterar los dominios de dimerización.

Estos resultados nos permiten explicar por un lado la alta relación R/C detectada en los extractos de esporas y por lo tanto la falta de linealidad en la actividad de PKA con la concentración del homogenato ya que la subunidad R libre al estar en gran exceso con respecto a la holoenzima puede inhibir a la subunidad C. Por otro lado se sugiere una explicación para la independencia de la actividad de PKA con el cAMP detectado en los extractos de esporas. La holoenzima de 5.5 S que denominamos R"C (que es dependiente de cAMP), se disociaría espontáneamente después de la dilución hecha al extracto para hacer el ensayo de

actividad. Esto se debería a una disminución en la afinidad entre R" y C en el dímero, comparándola con la interacción R-C en la holoenzima nativa.

Hay que tener en cuenta que la interacción entre la subunidad R y la subunidad C no está restringida a un solo punto de contacto sino por el contrario está definida por una región que se encuentra entre los residuos 90 y 100 de la subunidad regulatoria, conocida como región "hinge" o bisagra. Esta región contiene la secuencia consenso de aminoácidos que es importante en el reconocimiento de sustratos por la subunidad catalítica. El residuo serina de esa secuencia es el sitio de autofosforilación en las R de tipo II. Esta región parece ser crítica para la unión de la subunidad catalítica y hay varias evidencias que confirman la importancia de esta región para la interacción de R con C. Primero esta región es protegida de la proteólisis (186,187,176), segundo la autofosforilación disminuye la afinidad entre R y C (84), tercero mutaciones en el sitio de pseudofosforilación de RI (en la Ala 97), alteran la reasociación entre las dos subunidades; por último mutaciones en la Ser-145 (sitio de autofosforilación propuesto para la R de levaduras) reduce notoriamente la capacidad de la subunidad regulatoria de reasociarse con la subunidad catalítica.(176). Todo esto indica que la región bisagra es un punto de contacto importante entre las dos subunidades de la PKA. El dominio de dimerización parece no ser crucial para la interacción de ambas subunidades, mientras las argininas adyacentes a la serina fosforilable si lo son, ya que el clivado después de la arginina 93 produce un fragmento que es capaz de unir cAMP pero no de unir C (188).

Para la R de tipo II se vió que la proteólisis limitada de la subunidad hasta las dos argininas (sin incluirlas) cercanas a la serina fosforilable, genera una proteína capaz de unirse a la subunidad C para formar la holoenzima. Si el clivado incluye a las argininas se genera una subunidad R que es incapaz de unirse con alta afinidad a la subunidad C (189,190,191). También se ha demostrado que por tratamiento con tripsina de R purificada se obtienen fragmentos (37-39 kDa) de esta subunidad pero que son monoméricos y si bien retienen la capacidad de unión de cAMP tienen altamente reducida la capacidad de asociarse con la subunidad C e inhibir la actividad catalítica (192). Se determinó también (193) que durante la purificación de R_{II} de músculo de conejo se generaban fragmentos de 42 kDa y de 37 kDa por proteólisis endógena. Ninguno de estos fragmentos son diméricos. El fragmento de 42 kDa muestra una notable similitud a la subunidad R nativa en cuanto a su capacidad de inhibición de C. Sin embargo se vió que era más susceptible a la disociación por histona o polilisina el complejo monomérico 42 kDa-C que la R_{II}-C. El fragmento de 37 kDa tiene altamente disminuída la capacidad de unir C. Esto indicó que parte de la secuencia de aminoácidos que están entre el amino terminal de los fragmentos de 42 y 37 kDa, sería necesaria para una eficiente interacción entre R y C. También se ha sugerido que los residuos Asp-Arg que están precediendo el sitio de autofosforilación en R_{II} de corazón bovino son necesarios para la unión de C (189).

Al parecer R_1 se comportaría de manera diferente ya que se demostró utilizando subunidades R_1 expresadas en *E. coli*, que la delección hasta el residuo 91 (P-6) no disminuía la interacción R-C, sino más bien la impedía ya que estas R deletadas tenían una K_d para la interacción con C menor que la subunidad R nativa (194). También para R_1 serían esenciales en la interacción con C (195).

Se ha demostrado que en *Drosophila* (en trabajos relacionados con el aprendizaje y memoria), existe una proteasa dependiente de calpaína (195'); en homogenatos de cerebro la subunidad reguladora de la PKA es un sustrato preferido por esta proteasa (195"). Su activación produce una subunidad reguladora proteolizada con un peso molecular menor y una afinidad por la subunidad catalítica muy reducida. Se demostró (195") además que la PKA formada por esa subunidad catalítica necesita menores concentraciones de cAMP para ser activada que la PKA que posee la subunidad R intacta.

1.3.2- Extractos de los distintos tiempos de germinación

El segundo panel de la figura 11 muestra las especies encontradas en un extracto proveniente de 60 min de germinación. La R' sufre pocos cambios. El pico de 5.5 S, en cambio, disminuyó considerablemente con lo cual el hombro correspondiente a la holoenzima de 8.8 S que apenas se hacía notorio en esporas ahora es mucho más evidente.

Teniendo en cuenta las explicaciones dadas en el punto anterior, podemos recordar aquí que la disminución en este pico correspondería a la

degradación de la subunidad C como consecuencia de la activación de la holoenzima en respuesta al pico de cAMP. La subunidad R producida de esta manera no se haría evidente ya que quedaría enmascarada por la subunidad R' libre preexistente.

En los extractos correspondientes a este tiempo de germinación se detectó un cierto grado de dependencia con el cAMP (la relación de actividades - cAMP/+cAMP, fue de 0.5). Se puede entender teniendo en cuenta que la enzima aquí también está inhibida por el exceso de R y que por lo tanto para medir actividad de PKA hubo que hacer también altas diluciones (1:40-1:80), que en este caso no son suficientes para disociar espontáneamente a la holoenzima de mayor S, la cual está en este estadio en mayor proporción que la especie R"C de menor afinidad en la interacción R-C.

En los otros paneles se ven los gradientes correspondientes a las siguientes horas de germinación. Se puede observar que la actividad de unión de cAMP de la R de 2.7 S y la especie de 5.5 S disminuyen en paralelo y a su vez va aumentando la especie nativa de 8.8 S a partir de las 4 hs. El perfil observado a las 7 hs es el mismo que corresponde a los cultivos de horas más tardías, durante la etapa logarítmica de crecimiento (128). Concluimos del análisis de estos gradientes que en esporas existe una actividad quinasa dependiente de cAMP, en forma de una holoenzima de 5.5 S cuya actividad está aparentemente inhibida en los extractos por un exceso de subunidad R, la cual es también menor que la R nativa y tiene un S de 2.7.

Se corrobora que la subunidad C disminuye entre 0 y 1 hora, después del aumento de cAMP. Dado esto inferimos que la especie RⁿC sería capaz de generar C que disminuye abruptamente entre 0 y 1 hora y que por lo tanto la especie monomérica RⁿC es fisiológicamente activa. Esta especie no parece ser sintetizada *de novo* una vez iniciada la germinación, sino que la especie que aparece luego por síntesis sería la holoenzima nativa tetramérica.

Todo esto indicaría que la PKA se activa muy pronto después de iniciada la germinación, y por lo tanto tendría un rol importante en el inicio de la misma. Como luego de la primer hora de germinación, la concentración y actividad específica de R y C van disminuyendo hasta alcanzar niveles mínimos a las 3 hs, podríamos pensar que la PKA no sería necesaria en la morfogénesis y el crecimiento hasta el momento de emitir el tubo germinativo. A las 6 hs los valores alcanzados por R y C son altos. Resultados de nuestro laboratorio (155 y comunicación personal de E. Pereyra), sugieren que la PKA participa en el proceso de emisión del tubo germinativo. El agregado de análogos de cAMP al medio de cultivo de esporangiosporas de *M.rouxii*, promueve un crecimiento isodiamétrico en aerobiosis en lugar del esperado crecimiento polarizado. Como consecuencia del agregado de los análogos, los niveles de actividad catalítica a las 7-8 hs de cultivo disminuyen, mientras que los de la R permanecen casi constantes (E.Pereyra y S. Moreno, manuscrito en preparación). Por lo tanto el efecto sobre la morfología es el resultado de una "down-regulation" (depleción regulada) de la actividad fosforilante de PKA. Los resultados en los niveles de R y C y en la morfología son los mismos, ya sea que se agreguen los análogos al

tiempo 0 de la germinación o poco antes de la emisión del tubo germinativo. Esto hace pensar que recién a partir de las 5-6 hs de germinación es importante la regulación de la actividad de la PKA, al igual que lo que se deduce de las actividades específicas encontradas en este trabajo.

A las 6 hs de crecimiento, sin embargo, no se detecta un pico de cAMP que sugiera que es necesario que se active la PKA, pero hay que tener en cuenta que para calcular su concentración se usó como medida de volumen el de la célula en total. Se sabe que el crecimiento de las hifas es por sus extremos y que por lo tanto en esos puntos donde se emiten los tubos germinativos se pueden concentrar localmente enzimas y metabolitos, y es posible que estos cambios locales no se vean reflejados en la medición de niveles totales, como así también es posible que para las 6 hs las células hayan ido perdiendo su crecimiento sincronizado.

Se ha demostrado en otras especies de *Mucor* una variación en los tamaños de las proteínas que unen cAMP durante la germinación, semejante a la variación que presenta la subunidad R de *M.rouxii* vista a través del análisis de los gradientes de sacarosa. En *M.mucedo* y *M.genevensis* se ha visto que el cAMP interactúa específicamente con un número limitado de proteínas cuyo espectro cambia de una manera característica durante el tiempo de desarrollo desde esporangiosporas a hifas (158). Las proteínas con capacidad de unión de cAMP cambian notoriamente durante la germinación. La mayoría está en mayor proporción en las esporas y durante las primeras horas de germinación y luego disminuyen o algunas desaparecen. La proteína de mayor peso molecular

encontrada, en ambos hongos va aumentando con el curso del tiempo, presumiblemente por síntesis de novo. Las demás proteínas observadas son de menor tamaño y pueden provenir de proteólisis de una proteína de mayor peso molecular. Es de destacar también que en esporas las formas mayoritarias de proteínas que unen cAMP son las de menor peso molecular, mientras que la de mayor peso molecular está presente pero es minoritaria.

En otros sistemas de hongos fueron asociados diferenciación celular y desarrollo con variaciones en los niveles de PKA.

Para *B. emersonii* fue demostrado que la quinasa dependiente de cAMP se activa en los estados tempranos de la germinación, y que durante el desarrollo la actividad de PKA sufre cambios muy notorios (196). La actividad es baja en células vegetativas, aumenta durante la esporulación, es máxima en las zoosporas y va disminuyendo durante la germinación. Se vio además que tanto la subunidad C como R disminuyen en los estadios tempranos de la misma. Se encontró que la subunidad R aumenta durante la esporulación y alcanza los niveles máximos en las zoosporas, este aumento estaría dado por síntesis de novo de esta subunidad, la cual luego va disminuyendo a lo largo de la germinación (197). La subunidad C también aumentaría durante la esporulación y alcanzaría su pico máximo en zoosporas. Se demostró además que la variación en los niveles de los mRNAs de ambas subunidades van en paralelo con las concentraciones de sus proteínas (198).

En *Dictyostelium* se demostró que la PKA es importante y tiene roles esenciales durante su complejo desarrollo. La actividad de PKA sería esencial

en el desarrollo temprano (agregación), y en los estadios tempranos de la morfogénesis (pre-espora a espora y pre-talo a talo) (199,200).

En nuestro sistema ,*M.rouxii*, tenemos suficiente evidencia para asociar el desarrollo con variaciones en la PKA y asignarle un rol importante en el inicio de la germinación.

2- ACTIVIDAD EN CÉLULAS PERMEADAS

Dada la alta inhibición en la actividad de la PKA vista en extractos de esporas, atribuida a la alta relación R/C, se decidió medir la actividad de esta enzima en esporas permeadas para tener una idea más aproximada de lo que ocurre *in vivo*. En el sistema de células permeadas, se mantienen la localización y estructura de los componentes celulares, permitiendo hacer la medición de las actividades enzimáticas en condiciones que se asemejan más a las condiciones *in vivo*. Las actividades enzimáticas así medidas representan la suma de actividades individuales dentro de cada célula.

La actividad de PKA fue medida en células permeadas y en extractos crudos de esporas y de células de 60 y 90 minutos de germinación. En la tabla 3 están los valores obtenidos en ambos casos y las actividades relativas a esporas de cada tiempo.

Analizando estos datos podemos ver por un lado, que en células permeadas la actividad de PKA es practicamente la misma a 0, 60 y 90 minutos, mientras que en extractos crudos , la actividad con cAMP en esporas es 5 veces

TIEMPO DE CRECIMIENTO	ACTIVIDAD DE PKA				ACTIVIDAD RELATIVA (a esporas)	
	Células permeadas		Extractos		Células permeadas	Extractos
	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP		
0	0.3	4.0	41	44	1	1
60	1.3	3.3	9.5	18	0.8	0.4
90	0.6	5.5	2.7	8.8	1.3	0.2

TABLA 3

Actividad de PKA en células permeadas

El ensayo de medición de PKA se hizo como se describió usando por ensayo $0.8-1.6 \times 10^7$ células permeadas o $0.5-2 \mu\text{g}$ de proteínas de extractos (equivalente a $1.25-5 \times 10^5$ células). Los resultados están expresados en unidades por 10^{10} células.

Las últimas dos columnas representan las actividades de los distintos tiempos dividida la actividad de esporas.

superior a la de los 90 min Por otro lado, si comparamos los valores de actividad obtenidos para cada tiempo en células permeadas con los obtenidos en extractos crudos, se puede ver que mientras la actividad detectada en esporas permeadas es 10 veces menor que en extractos crudos, las actividades en células de 90 minutos son casi iguales en permeadas y extractos. Dado que las condiciones en que se midió actividad de PKA en extractos crudos fueron consideradas las mejores para medir actividad total de esta enzima , los resultados sugieren entonces que en esporas permeadas no se midió toda la actividad de PKA. Para descartar la posibilidad que las esporas estuvieran incompletamente permeadas, se midió actividad de unión de cAMP de la subunidad R y se obtuvieron los mismos valores que en extractos crudos, por lo tanto si pudo entrar en estas esporas el [^3H]cAMP, es posible que también pudieran hacerlo otros compuestos como el kemptido, ATP, Cl_2Mg , y cAMP necesarios para determinar actividad de PKA.

¿Por qué en esporas permeadas se pudo medir sólo una proporción muy baja de la actividad de la subunidad C ? Los resultados nos hacen pensar en la inhibición endógena de la actividad de PKA que es liberada experimentalmente en los extractos por dilución. El gran exceso de subunidad R' a 0 h y 1h podría ser suficiente para producir esta inhibición, sin embargo no se puede descartar la existencia de un inhibidor como el descrito en eucariotas superiores (101). Se intentó encontrar un inhibidor termoestable específico de PKA pero los resultados fueron negativos.

Otra observación que se puede hacer de estos resultados es la dependencia por el cAMP de la PKA de esporas como también se determinó en los experimentos de los gradientes de sacarosa. Esto sería una evidencia más que indicaría que la pérdida de dependencia por el cAMP en los extractos es por efecto de la disociación de la enzima por la dilución hecha en el ensayo.

Ha sido puntualizado que la PKA, a concentraciones fisiológicas (en el orden de μM), necesita de altos niveles de cAMP para ser activada (177), y que estos niveles son mayores cuanto mayor sea la relación R/C (201,122). También se propone que a altas concentraciones de PKA puede existir la especie $\text{R}_2\text{C}_2\text{cAMP}_4$ y que esta especie puede poseer algo de actividad catalítica (185). En nuestro laboratorio se demostró en ensayos *in vitro* que una concentración de enzima de 0.17 nM es activada un 50% por 40 nM de cAMP cuando se usan protamina o histona como sustratos, mientras que cuando se usa kemptido no se obtiene más que un 30% de activación con 10 μM de cAMP (130). Esto sugirió un rol para los sustratos en el proceso de activación de la PKA. Nos llama la atención cómo es posible que la holoenzima dimérica y la holoenzima nativa presentes en esporas sean activadas en respuesta a un aumento de cAMP de no más de 10 veces habiendo un exceso de 4 veces de subunidad R; seguramente los sustratos proteicos tienen que ver en este proceso; por esta razón fue nuestro interés hacer un estudio preliminar para encontrar qué proteínas son fosforiladas por la PKA durante el inicio de la germinación, las cuales podrían participar en el proceso de activación de esta enzima.

3- ANÁLISIS DE SUSTRATOS ENDÓGENOS DE PKA EN ETAPAS TEMPRANAS DE LA GERMINACIÓN DE *M. rouxii*

Una vez determinado que la PKA tendría un rol importante en las etapas tempranas de la germinación, fue de nuestro interés encontrar posibles sustratos de esta quinasa que estuvieran involucrados en el inicio de este proceso. Cuando la PKA se activa, la subunidad catalítica libre es capaz de fosforilar proteínas sustrato, las cuales modifican su estado de fosforilación y su actividad biológica en algún sentido. Se ha demostrado en *M. rouxii* que el aumento en los niveles del cAMP, durante la germinación, dispara una cascada de fosforilaciones, como consecuencia de la cual ocurre, por ejemplo, la activación de la trehalasa (159). Además en experimentos de germinación temprana en esporas de *M. rouxii* se determinó la existencia de una correlación directa entre el contenido de cAMP intracelular y la actividad de fosfodiesterasa de cAMP y se ha demostrado que la actividad de esta enzima aumenta *in vitro* por la fosforilación mediada por PKA, sugiriendo que existe una regulación de su actividad por fosforilación dependiente de cAMP(160). Todo esto sugiere fuertemente que a consecuencia del aumento transiente de cAMP la PKA fosforila diferentes sustratos, produciéndose así una cascada de fosforilaciones. Dado estos antecedentes y nuestros resultados de activación de la PKA al iniciarse la germinación iniciamos los estudios de sustratos de la PKA.

Un sustrato de la PKA es la misma subunidad R de la enzima para las PKA de tipo II. En el caso de *M. rouxii* aun no estaba determinado si la PKA era

susceptible de autofosforilación. Entonces como primer abordaje en el estudio de sustratos fosforilables por PKA se investigó la autofosforilación de esta enzima.

3.1- AUTOFOSFORILACIÓN DE PKA DE *M. rouxii*

Para investigar si la PKA de *M.rouxii* se autofosforila se hicieron los siguientes experimentos.

3.1.1- Correlación entre proteínas fosforiladas y actividad de PKA

El objetivo de este abordaje experimental fue determinar si existían alguna o algunas proteínas cuya fosforilación correlacionara con la actividad de PKA, lo cual sería considerado como primer indicio de probable autofosforilación de la misma.

Para esto un extracto de *M.rouxii* obtenido de fase logarítmica de crecimiento, fue acidificado a pH=6 y sembrado en una columna de fosfocelulosa; de esta manera se depletó al extracto de caseína quinasa II, ya que a este pH ésta queda retenida en este tipo de resina. Esta quinasa que es probablemente autofosforilable como en otros sistemas biológicos (202), eluye de una DEAE-Sepharosa muy próxima a la PKA (163), por lo tanto la eliminación de la caseína quinasa II evitó posibles interferencias en los ensayos para determinar autofosforilación de PKA.

El percolado de la columna de fosfo-celulosa, fue sembrado en una columna de DEAE-Sepharosa y eluido con un gradiente lineal de ClNa de 0 a 0.6 M. En alícuotas de las fracciones obtenidas en esta columna se realizaron varios ensayos: concentración de proteínas, actividad de PKA usando kemptido como sustrato en presencia de cAMP y fosforilación de sustratos endógenos en ausencia de cAMP. Los ensayos de fosforilación endógena fueron hechos incubando a 4°C durante sólo 2 minutos, condiciones que no afectan significativamente a las reacciones de autofosforilación mientras que desfavorecen las fosforilaciones de otras proteínas. Cada ensayo fue dividido en dos fracciones, en una se midió radioactividad incorporada a proteínas y la otra se analizó por SDS-PAGE para visualizar las proteínas fosforiladas por autorradiografía.

En la figura 13 se puede observar que las fracciones con actividad de PKA coinciden con las fracciones que presentan mayor fosforilación endógena.

Cuando se analizaron las fracciones en SDS-PAGE y autorradiografía, se vió que la aparición y desaparición de dos proteínas cuyo PM oscila alrededor de los 60 kDa, coincide con las fracciones en que se detectó actividad de PKA. Se ve también otra proteína de 30 kDa aproximadamente, pero ésta no correlaciona con actividad de PKA, ya que se observa su aparición cuando ya casi no se mide actividad de PKA y desaparece mucho después que ésta.

Las proteínas de aproximadamente 60 kDa provendrían de una reacción de autofosforilación y podrían ser parte de la subunidad regulatoria de PKA. Se había estimado anteriormente (126) un PM de 75 kDa para la subunidad R

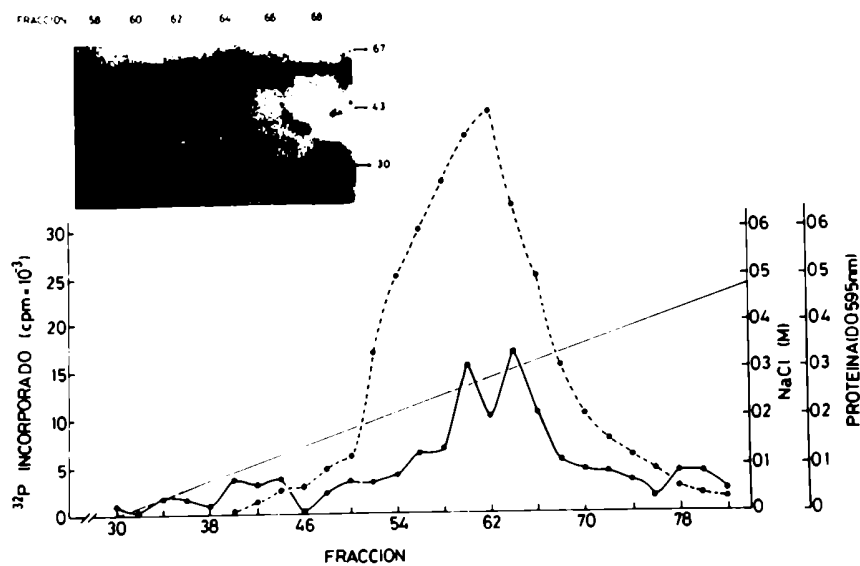


Figura 13

Asociación de fosforilación endógena con actividad de PKA en cromatografía en DEAE-Sepharosa.

Alicuotas de las fracciones fueron ensayadas para determinar proteínas (.....), actividad de PKA (---◆---) y fosforilación endógena (—◆—). Alicuotas de las fracciones indicadas fueron analizadas en gel de poliacrilamida 12 % con SDS (inserto).

monomérica nativa, por lo tanto estas proteínas deberían ser producto de proteólisis.

3.1.2.- Linearidad y dependencia con la temperatura de la reacción de autofosforilación

Las reacciones de autofosforilación intramoleculares a diferencia de las reacciones de fosforilación intermoleculares, son eficientes a temperaturas de incubación bajas y tiempos de incubación cortos.

Para analizar si la fosforilación de las proteínas de 60 kDa, mencionadas en el punto anterior, podían deberse a una reacción de autofosforilación intramolecular y no a una fosforilación intermolecular, se procedió a estudiar la dependencia de la reacción con la temperatura, el tiempo de incubación y la concentración de enzima usada en el ensayo.

Se utilizó como fuente de enzima, una preparación parcialmente purificada hasta la etapa de gradiente de sacarosa. Cantidades variables de esta enzima fueron incubadas a 30 °C durante 20 minutos y durante 2 minutos a 30°C y 4°C (ver figura 14). Comparando el tiempo de incubación, la fosforilación de las proteínas en general cayó drásticamente cuando se lo disminuyó. Cuando se disminuyó la temperatura de 30°C a 4°C pero incubando sólo 2 min, hubo una leve disminución de las proteínas fosforiladas pero tres de ellas fueron eficientemente fosforiladas en estas condiciones; sus PM son de 63, 53 y 30 kDa y están

indicadas como **b**, **c** y **d** en la figura. La proteína indicada como **a** no se fosforiló con eficiencia cuando se disminuyeron la temperatura y el tiempo de incubación.

En el panel izquierdo se observa la variación en las fosforilaciones con la alícuota de enzima. Las bandas correspondientes a las 4 proteínas **a**, **b**, **c** y **d**, fueron cortadas del gel, una vez seco y expuesto, y sumergidas en el líquido de centelleo para contar la radioactividad. Con estos datos se construyeron los gráficos de la figura 14. Las fosforilaciones de las proteínas **b**, **c** y **d** tienen una correspondencia lineal con la concentración de las proteínas del extracto. Esto sugiere que la fosforilación de las mismas ocurrió por un mecanismo intramolecular (203). La proteína **a** sin embargo, no se fosforila en forma proporcional a la cantidad de proteína, sino que del gráfico se ve que a altas concentraciones, la fosforilación es menor a las esperadas para que sea proporcional. Esto es de esperar para una reacción de fosforilación intermolecular, para la cual la variación simultánea en la concentración de sustrato, enzima y posibles inhibidores, tienen influencia sobre la velocidad de reacción (203).

Las reacciones intramoleculares, en cambio, son muy eficientes, rápidas, en general no alteradas por inhibidores e independientes de la concentración de enzima (203).

Dado entonces la proporcionalidad encontrada en las reacciones de fosforilación de las proteínas **b**, **c** y **d** de 63, 53 y 30 kDa, y su eficiencia a bajas temperaturas y tiempos cortos de incubación, podemos decir que estas proteínas se fosforilaron por una reacción de autofosforilación intramolecular.

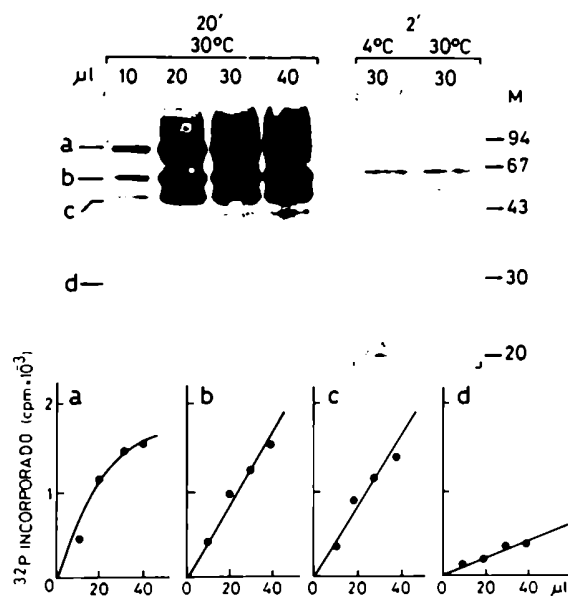


Figura 14

Dependencia de la fosforilación endógena con la concentración de proteínas, tiempo y temperatura de incubación.

Cantidades variables de la preparación enzimática proveniente de una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, fueron incubadas los tiempos indicados a 30 o 4 °C en las condiciones descritas para fosforilación endógena. Cada mezcla de reacción fue luego analizada por SDS-PAGE 12% (panel superior). Las bandas indicadas en la autorradiografía como a-d, fueron cortadas del gel seco y se midió la radioactividad (panel inferior).

Estas proteínas al igual que las que se detectaron en las fracciones de DEAE, en donde se vió que se fosforilaban proteínas cercanas a los 60 kDa y otra de 30 kDa, serían todas productos de proteólisis de la subunidad R. Como veremos más adelante también, en cada preparación de esta subunidad R las proporciones relativas e incluso el tipo de producto de proteólisis varió (ver fig. 16).

3.1.3- Elución específica de fosfoproteínas de cAMP-agarosa

Para poder afirmar que estas proteínas corresponden a la subunidad regulatoria de la PKA, se analizó el comportamiento de la mismas en cAMP-agarosa. La subunidad R tiene sitios de unión para el cAMP, por lo tanto en una resina de cAMP-agarosa queda retenida, específicamente. A la resina también se unirán otras proteínas pero en forma no específica, las cuales podrán ser eliminadas haciendo lavados con buffer con alta fuerza iónica. Se usó una preparación concentrada de PKA, proveniente de una DEAE-Sepharosa, la cual fue sometida a fosforilación con $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ a 30°C durante 10 min. La preparación fue sembrada en una columna de cAMP-agarosa que fue lavada exhaustivamente con ClNa 2 M y eluida específicamente con cAMP 10 mM.

Una alícuota de la preparación sembrada en la columna y alícuotas correspondientes a los lavados con buffer solo y buffer con ClNa , y finalmente una alícuota de la fracción correspondiente al eluido específico con cAMP, fueron analizadas por SDS-PAGE y autorradiografía. En la figura 15 A se puede observar la gran cantidad de proteínas fosforiladas que no son retenidas por la columna o

que eluyen con ClNa 2M. Solo tres proteínas de 63, 53 y 30 kDa fueron retenidas en la columna de cAMP-agarosa y eluidas en forma específica. Este comportamiento concuerda con lo esperado para la subunidad R.

También se hizo el experimento inverso, consistente en retener a la R en cAMP-agarosa. Para ello se analizó la desaparición de bandas específicas por retención en esa resina. Se utilizó también una preparación enzimática proveniente de DEAE. Esta preparación fue puesta en contacto con la cAMP-agarosa habiendo sido fosforilada previamente o no, pero no en forma exhaustiva como en el caso anterior, sino en condiciones de autofosforilación. En el primer caso se sometió a la preparación enzimática a condiciones de autofosforilación durante 5 min a 4°C. Inmediatamente se separó la fracción en dos mitades, a una se agregó buffer de siembra para geles (fracción 1) y la otra se incubó con cAMP-agarosa durante 10 min a 4°C. Luego al sobrenadante se le agregó buffer de siembra para geles (fracción 2). Por otro lado se sometió a la fracción de DEAE primero a la incubación con cAMP-agarosa, y luego el sobrenadante se incubó en condiciones de autofosforilación 5 min a 4 °C, finalmente se agregó buffer de siembra (fracción 3). Las tres fracciones fueron corridas en gel y luego se hizo autorradiografía.

Se puede ver en la figura 15 B que las proteínas de 63 y 53 kDa que aparecen por autofosforilación (fracción 1), disminuyen luego de poner en contacto el extracto con la cAMP-agarosa (fracción 2), y dejan de fosforilarse cuando el extracto fue previamente incubado con la resina de afinidad (fracción 3). Estos experimentos son una evidencia más de que las proteínas de 63 y 53 kDa serían subunidad R, ya que se retienen en cAMP-agarosa.

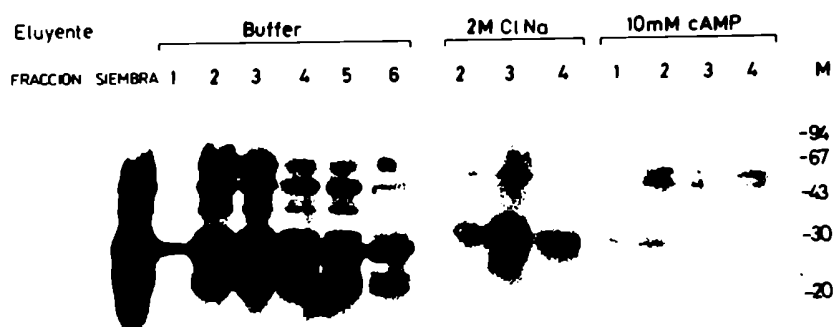


Figura 15 A

Cromatografía en cAMP-agarosa de proteínas fosforiladas endogenamente.

Una alícuota de PKA proveniente de una DEAE-Sepharosa fue sometida a fosforilación durante 5 min a 30 C y analizada por cromatografía de cAMP-agarosa. La primera calle corresponde a la alícuota de PKA fosforilada sembrada en la columna de cAMP-agarosa. Las calles siguientes corresponden a los eluidos indicados. Solo se muestran las primeras 6, 3 y 4 fracciones de las eluciones con buffer A (30 fracciones totales), con ClNa 2M (20 fracciones totales) y con cAMP (6 fracciones totales).

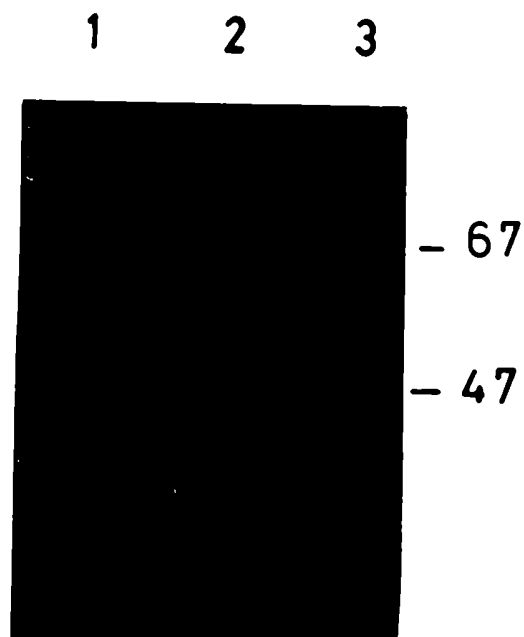


Figura 15 B

Retención de subunidad R en cAMP-agarosa.

La fuente de enzima es una preparación de DEAE-Sepharosa. Esta enzima se sometió a fosforilación en condiciones de autofosforilación a 4°C durante 5 min. (fracción 1), y se incubó con cAMP-agarosa durante 10 min. y luego se separó el sobrenadante (fracción 2). También la enzima fue primero incubada con la cAMP-agarosa y luego el sobrenadante sometido a condiciones de autofosforilación (fracción 3). Alicuotas equivalentes de las fracciones fueron luego analizadas por SDS-PAGE y autorradiografía.

3.1.4- Fosforilación de subunidad R purificada

Se purificó la subunidad R, como se explicó en materiales y métodos, siguiendo la metodología estandar usando cAMP-agarosa.

En la figura 16 se ve el resultado de dos purificaciones distintas de R. Como se puede apreciar las dos preparaciones muestran distintos productos de proteólisis de R. Las preparaciones de R purificadas siempre se obtuvieron proteolizadas a pesar de haber hecho todos los pasos de la purificación en presencia de inhibidores de proteasas y a 4 °C.

En la calle 1 de la figura se observa que los productos de proteólisis más abundantes en esta preparación son de 63, 53 y 35 kDa, pero también se ven bandas de menor abundancia alrededor de estas proteínas mayoritarias. En la calle 2, en la cual se sembró una alícuota de otra preparación se ven bandas correspondientes a proteínas de mayor PM, pero aún menores que el PM estimado para una subunidad R intacta (75 kDa) (126), lo cual indicaría que en estas preparaciones, no se obtuvo la forma nativa de la subunidad R.

Una alícuota de la preparación de R purificada (calle 2), se incubó con [γ ³²P]ATP y subunidad C, durante 15 min a 30°C.

Luego parte de esta preparación fue sometida a proteólisis limitada con tripsina, para lo cual se incubó la R fosforilada con tripsina a 4°C durante 2 y 6 minutos. Se analizaron luego estos ensayos por SDS-PAGE y autorradiografía.

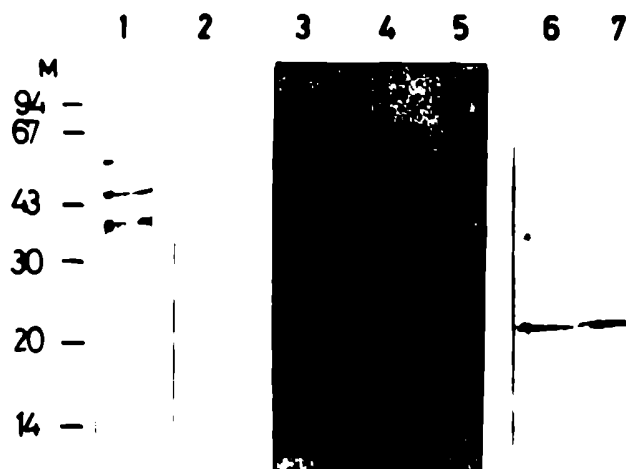


Figura 16

Fosforilación de subunidad R purificada.

Calle 1 y 2 corresponden a 30 y 10 μg de subunidad R purificada de dos preparaciones distintas. Subunidad R de la calle 2 fue fosforilada durante 15 min a 30 $^{\circ}\text{C}$ con subunidad C. Una alicuota fue sembrada en la calle 3 y otras dos fueron incubadas a 4 $^{\circ}\text{C}$ con 0.1 mg/ml de tripsina durante 6 min (calles 1 y 3) o 2 min. (calles 5 y 7). Las calles 1, 2, 6 y 7 fueron visualizadas por Coomassie-Blue.

En la calle 3 de la figura se ve la R purificada fosforilada sin tratar con tripsina. Se puede observar que existe una correlación entre las proteínas visualizadas con Coomassie-Blue y las proteínas fosforiladas, a excepción de la banda de 35 kDa, para la cual la fosforilación es mucho menor.

La proteólisis limitada de estas R de distintos pesos moleculares dió como productos únicos una serie de fragmentos de alrededor de lo 35 kDa que están fosforilados y una proteína de 23 kDa que no está fosforilada (calles 4-7). La fuerte intensidad de esta banda (23 kDa) sugiere que todas las bandas presentes en la calle 3 han contribuído a generar esta especie.

Se ha descrito previamente (188) que la subunidad R de eucariotas superiores presenta una región susceptible al clivado proteolítico. Haciendo este clivaje cada subunidad regulatoria es cortada en dos fragmentos, un dominio carboxilo terminal (31-37 kDa) que retiene la serina fosforilable y los sitios de unión de cAMP, y un dominio amino terminal (10- 19 kDa) que retiene el sitio de dimerización. La tripsina cliva más precisamente entre las dos argininas previas a la serina que se fosforila por autofosforilación .

La proteólisis obtenida en el caso de la R de *M.rouxii* concuerda con la obtención de los fragmentos esperados. Esto se tomó como una evidencia más de que esta proteína purificada correspondía a la subunidad R. Por analogía con las R de eucariotas superiores, los fragmentos de aproximadamente 35 kDa corresponderían al dominio carboxilo-terminal, que conserva la serina-P y el de 23 kDa correspondería al dominio amino terminal. Se ven además bandas que corresponden a fragmentos no fosforilados de alrededor de 35 kDa; quizás estos

fragmentos sin fosforilar aparezcan por cortes con tripsina en algún sitio adicional, de tal manera que pierden la serina fosforilada.

En las calles 2 y 3 se puede ver que un fragmento de 35 kDa también existe cuando aún no se hizo tratamiento con tripsina, lo cual indicaría que ese fragmento es un intermediario de proteólisis con alta probabilidad de formarse. Es coherente que este producto de proteólisis se una a la cAMP-agarosa, pues tendría los sitios de unión de cAMP, y que no se fosforile ya que tiene interrumpida la secuencia consenso de autofosforilación.

En cambio el fragmento de 23 kDa no se ve en la preparación de R, ya que no sería retenido en la cAMP-agarosa, por no tener los sitios de unión de cAMP.

3.1.5.- Integración de resultados

Hasta aquí tenemos suficiente evidencia para afirmar que la PKA de *M.rouxii* se autofosforila.

* Se han encontrado proteínas de alrededor de 60 kDa que se fosforilan y que correlacionan con la actividad de PKA en una DEAE-Sepharosa, las cuales probablemente sean los productos principales de una proteólisis endógena de la subunidad R.

* Estas mismas proteínas se fosforilan en un proceso muy eficiente, independiente de la temperatura y de la concentración de enzima.

* Estas proteínas se unen específicamente a una cAMP-agarosa.

* Finalmente, la subunidad R purificada puede ser fosforilada por la subunidad catalítica en una región con propiedades semejantes a las del dominio de autofosforilación de la subunidad R de las PKA tipo II de eucariontes superiores.

3.2- INFLUENCIA DE LA FOSFORILACIÓN DE LA HOLOENZIMA SOBRE SU ACTIVACIÓN Y DISOCIACIÓN

Para determinar si la autofosforilación de la PKA de *M.rouxii* tenía consecuencia en la activación y disociación de la holoenzima se hicieron dos experimentos diferentes.

Primero se ensayó la dependencia de la actividad de la holoenzima con la fosforilación .

Se ha demostrado (130) que la activación de PKA de *M.rouxii* no es completa cuando se incuba la holoenzima con ATP-Mg, Kemptido y cAMP, y que se requiere para su activación máxima , la presencia de proteínas básicas, tales como histona y polilisina o C1Na. Este efecto se deduce de la falta de linealidad en la actividad de la enzima, cuando aumenta la concentración de la misma.

En este primer abordaje, enzima parcialmente purificada por DEAE-Sepharosa fue sometida a autofosforilación por incubación con 50 μ M de ATP no radioactivo, 5 minutos a 4°C. Esta preparación fue utilizada como fuente de enzima fosforilada. Preparaciones de enzima fosforilada y "no fosforilada"(sin el

tratamiento anterior) fueron usadas para ensayar sus actividades con Kemptido como sustrato en las condiciones estandar de ensayo.

Como se puede observar en la figura 17, cuando se usa fosfo-holoenzima la reacción es lineal en el rango de concentraciones ensayadas, mientras que cuando se usa la enzima tal cual, la reacción deja de ser lineal con 10 μ l de enzima. Hay que tener en cuenta que no se pueden comparar los valores absolutos graficados ya que el ATP no radiactivo usado para fosforilar a la enzima muy probablemente se mantenga en su sitio de unión y sea usado entonces en los primeros eventos de catálisis.

Al igual que lo publicado anteriormente (130), interpretamos la pérdida de linealidad de la actividad con respecto a la concentración de la enzima usada como debida a una falta de activación completa de la enzima; concluimos por lo tanto que la enzima fosforilada se activa más que la enzima no fosforilada.

El segundo experimento para estudiar la influencia de la autofosforilación en la interacción R-C consistió en medir la recuperación de la subunidad catalítica de dos columnas de cAMP-agarosa, que fueron sembradas con holoenzima y fosfo-holoenzima.

Como ya se explicó, la PKA de *M.rouxii* no se disocia con cAMP solo, por lo tanto cuando una holoenzima se siembra en una columna de cAMP-agarosa, para poder separar las subunidades R y C, y obtener C libre, se debe agregar al buffer de elución CNa 0.5 M (126). Cuando en la columna se sembró enzima fosforilada, se obtuvo subunidad catalítica libre, en el lavado con buffer sin CNa y

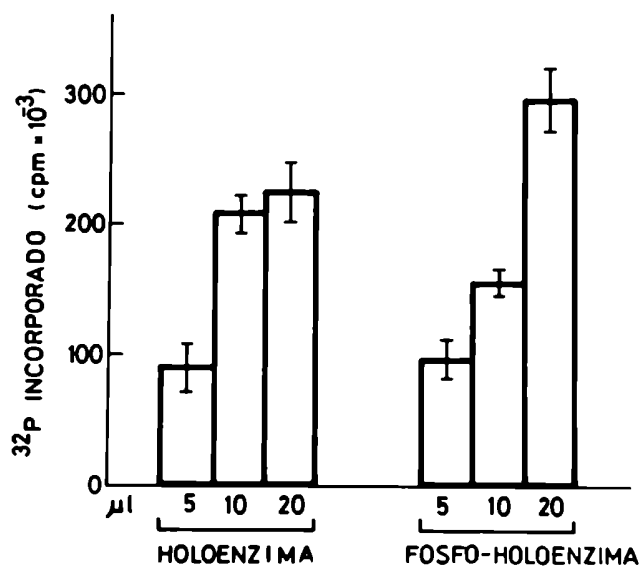


Figura 17

Dependencia de la actividad de la holoenzima con la fosforilación

La actividad de PKA de holoenzima (proveniente de DEAE-Sepharosa) y de forma fosforilada fue medida en las condiciones estandar usando kemptido como sustrato, en presencia de cAMP. La fosfoholoenzima se obtuvo como ya fue indicado pero usando ATP no radioactivo.

en el lavado con ClNa 0.5 M. Mientras que cuando se sembró holoenzima no fosforilada sólo se obtuvo actividad en el lavado salino (tabla 4)

Hay que destacar que la recuperación de C total (fracciones eluidas con ClNa y fracciones eluidas sin ClNa), fue mucho mayor a partir de la preparación de holoenzima fosforilada.

Podríamos concluir que la disociación de la PKA de *M.rouxii* después de interaccionar con la cAMP-agarosa y en presencia de ClNa no es completa. La enzima fosforilada se disociaría en estas condiciones completamente o al menos más que en el caso anterior.

Por lo tanto parece que la autofosforilación de la subunidad R disminuye la afinidad entre las subunidades R y C. Esto se deduce del aumento de activación (fig.17) y disociación (tabla 4) de la fosfoholoenzima por cAMP.

Ya se ha sugerido en eucariotas superiores, que la autofosforilación de PKA II, disminuye la interacción R-C (84,205). Se ha estimado que las Kd de reasociación de $R_{II}(P)$ y $R_{II}(P)cAMP_2$ con C son tres veces superiores a las de reasociación de R_{II} y $R_{II}cAMP_2$ con C (106).

La R de *Saccharomyces* (producto del único gen BCY 1), posee un sitio de autofosforilación en la ser-145. Cuando esta serina fue reemplazada por alanina o glicina (aminoácidos no fosforilables) la subunidad R fue un potente inhibidor de la subunidad C. Por el contrario si se reemplazaba por treonina (aminoácido que también puede ser fosforilado), aspártico o glutámico (aminoácidos que por su carga negativa remedan al grupo fosfato incorporado a la serina), se reducía su

	ACTIVIDAD DE PKA (U/20 μ l)	
	ELUIDO C/BUFFER	ELUIDO C/CINa
HOLOENZIMA	70	900
FOSFO-HOLOENZIMA	1050	1200

Tabla 4

Disociación de holoenzima por cAMP-agarosa.

Dos alícuotas de PKA fueron incubadas a 30 °C con ATP 50 μ M y Cl_2 Mg10 mM; en un caso fue agregado a la columna de cAMP-agarosa a tiempo 0 y en el otro después de 5 min de incubación. En los dos casos las columnas fueron luego lavadas con buffer A y con CINa 0.5M en bufferA. Alícuotas de los eluidos fueron ensayadas para medir actividad de PKA en ausencia de cAMP.

propiedad de inhibir C. Por lo tanto con esto también se demuestra que la fosforilación de la subunidad R disminuye su afinidad por C (176).

Por otro lado, cuando se introdujo un sitio de fosforilación en R_I (de origen bovino) reemplazando la alanina 197 por una serina, se obtuvo una R_I que podía ser fosforilada por C en un proceso intramolecular en ausencia de cAMP. Comparando las velocidades de reasociación de R_I mutada y C con la de R_I mutada y fosforilada y C, se vio que la velocidad de reasociación era menor para R_I fosforilada+C que para R_I +C, infiriendo que en este caso también la autofosforilación reduce la afinidad R-C (206).

Cabe destacar que nuestros abordajes experimentales hechos para analizar el efecto de la fosforilación de la subunidad R en la interacción de las subunidades R y C, son los primeros en los que se estudia la influencia de la autofosforilación en la disociación R-C, ya que hasta el momento se ha estudiado su efecto en la reasociación de estas subunidades y no en la disociación.

Concluimos de nuestros resultados y basándonos en estos antecedentes que para la PKA de *M.rouxii* la autofosforilación de la subunidad R disminuye la interacción entre esta subunidad y la subunidad C, favoreciendo el proceso de activación y disociación por cAMP.

3.3- PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA LA SUBUNIDAD REGULATORIA

Los anticuerpos policlonales contra la subunidad R fueron preparados como se indicó en materiales y métodos a partir de PKA proveniente de DEAE-Sepharosa, de la cual se purificó subunidad regulatoria utilizando una columna de cAMP-agarosa.

En la figura 18 se ven inmunoblots de geles desnaturalizantes de dos preparaciones diferentes de R purificada (calles 1 y 3) y de S100 (calle 2), revelados con anticuerpos anti-R. En las preparaciones de R purificada el número de bandas detectadas fue variable y la más abundante es de 53 kDa. El análisis de inmunoblots de un S₁₀₀ (línea 2), reveló que la especie más abundante era de 72 kDa; esta banda debe representar la forma nativa del monómero de subunidad R, pues coincide con los pesos moleculares determinados por centrifugación en gradientes de sacarosa y filtración molecular (128), y por marcación por afinidad con 8-N₃-cAMP(³²P) (126).

Para minimizar la proteólisis que pudiera producirse durante los pasos de purificación y la que pudiera ocurrir *in vivo*, se prepararon extractos de células de pocas horas de crecimiento (8-9 hs), a los que se les agregó inmediatamente el buffer de siembra, hiviéndose 5 minutos a 100 °C. En la calle 4 de la figura 18 se puede ver que la forma más abundante presente en estos extractos es la de 72 kDa, pero también hay otras bandas de menor proporción. Se probó también si el agregado de distintos inhibidores de proteasas, cada uno solo o en combinación

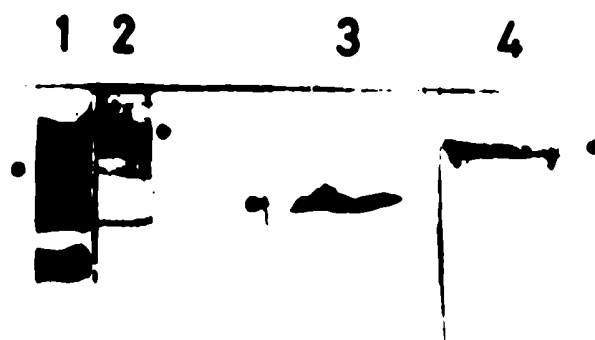


Figura 18

Inmunoblots de R purificada y de extractos crudos.

Western blots de 30 μg (calle 1) y 10 μg (calle 3) de R purificada de dos preparaciones diferentes, de 400 μg de S_{100} de micelio de 16 hs (calle 2) y de 400 μg de S_{10} de células crecidas 9 hs fueron revelados con anticuerpo anti- R a una dilución 1:250. Los puntos destacan las proteínas más abundantes con un PM de 56 kDa (calles 1 y 3) y 72 kDa (calles 2 y 4).

mejoraba el perfil obtenido en la fig.18 (calle 4). Inmunoblots obtenidos con extractos preparados con buffer solo, o con el agregado de uno o la combinación de los siguientes inhibidores de proteasas: PMSF, antipaina, y benzamidina fueron iguales (d.n.s), sugiriendo que los inhibidores son inadecuados para este sistema o que la proteólisis se produjo *in vivo* previo a la preparación del extracto.

Se ha descrito en *Blastocladiella emersonii* (197) que en la purificación de la subunidad R, a pesar de tomarse todos los recaudos posibles para evitar la proteólisis, siempre se obtuvieron formas proteolizadas de esta subunidad. También está demostrado que en este hongo, la actividad proteolítica es mayor en esporas que durante la germinación (207,208), y se ha probado la existencia de una proteasa alcalina presente en las esporas, que está involucrada en la proteólisis de la subunidad R (209,210). La actividad de esta proteasa aumenta durante la esporulación.

Para demostrar que las proteínas reconocidas por el anticuerpo eran la subunidad R intacta o segmentos proteolíticos de ella y por lo tanto demostrar su especificidad, se probó que estas proteínas poseían la capacidad de unir cAMP. Para esto se preparó subunidad R marcada con cAMP^[3H] por disociación de la holoenzima con cAMP^[3H] y 0.5 M ClNa y posterior separación de las subunidades por centrifugación en gradientes de sacarosa (ver materiales y métodos). El complejo [3H]cAMP₄R₂ así obtenido fue sometido a electroforesis en gel no desnaturalizante. Una vez corrido el gel se separó en dos mitades, una de las cuales fue transferida a nitrocelulosa para revelar con los anticuerpos; la otra mitad fue fraccionada en rodajas para medir la radioactividad. A partir de estos

resultados se calcularon los Rf correspondientes a la marca de [^3H] detectada y a las bandas reveladas por los anticuerpos.

En la figura 19 están graficados los dos picos de [^3H] detectados y se ve que corresponden exactamente con las 2 bandas que se detectaron en el Western-blot con los anticuerpos.

La sensibilidad del anticuerpo contra la forma nativa es mucho menor que contra las formas desnaturalizadas. Esto surge de comparar la intensidad de las bandas en la fig.18 y en la fig.19 correspondientes a los Western-blots provenientes de geles nativos y desnaturalizantes respectivamente y porque se hizo un cálculo aproximado de la cantidad de subunidad R sembrada en cada uno de ellos y se vió que en cada calle del gel nativo hay casi 10 veces la cantidad de R que hay en cada calle del gel desnaturalizante. Hay que recordar que los anticuerpos fueron hechos utilizando subunidad R purificada y desnaturalizada.

Las dos bandas reveladas pueden corresponder a formas proteolizadas de R. En los Western-blots de geles desnaturalizantes como dijimos se ven bandas que pueden corresponder a distintas formas proteolizadas de R.

Si bien se corroboró la especificidad del anticuerpo, no está demostrado que todas las bandas reveladas en el Western de geles desnaturalizantes correspondan a la subunidad R. Es de esperar que las bandas de mayor intensidad correspondan a esta subunidad dado que las muestras que se usaron para preparar los anticuerpos estaban enriquecidas en subunidad R. Se ha demostrado en eucariotas superiores la existencia de proteínas asociadas a la subunidad R,

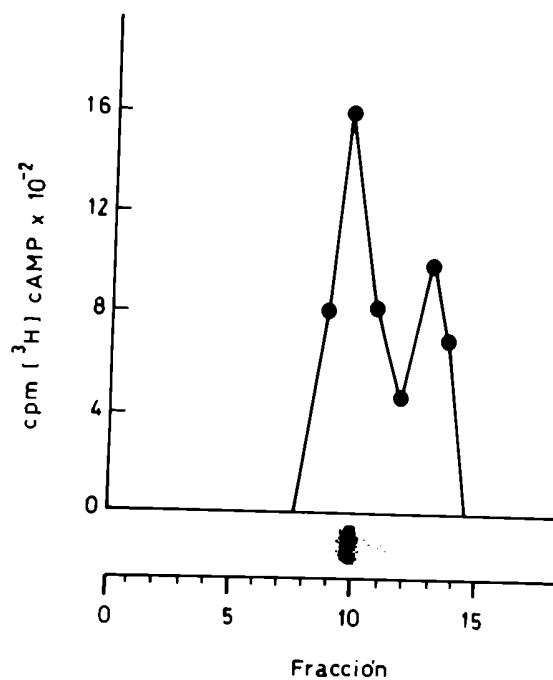


Figura 19

Especificidad del anticuerpo anti-R

El complejo $[^3\text{H}]$ cAMP $_4$ R $_2$ fue corrido en un gel no desnaturizante. Una de las calles fue cortada en rodajas de 2 mm a las cuales se les midió la radioactividad. Con otra calle se hizo un Western-blot y se reveló usando el anti R a una dilución 1:100. Luego se calcularon los Rf de los puntos de mayor radioactividad y de las bandas reveladas con el anticuerpo.

conocidas como AKAPs (A Kinase Anchor Protein) (94). No se puede descartar entonces la posibilidad que al ser un anticuerpo policlonal, reconozca además alguna proteína del tipo de las AKAP, que pueda estar presente, aunque sea en mínima proporción, en las muestras que se usaron para preparar los anticuerpos. Estos anticuerpos fueron utilizados en experimentos posteriores.

3.4- ANÁLISIS DE SUSTRATOS ENDÓGENOS EN ETAPAS TEMPRANAS DE LA GERMINACIÓN

Con la idea de buscar otros sustratos endógenos de la PKA, además de la propia subunidad R, buscamos proteínas que pudieran ser fosforiladas o desfosforiladas en las etapas tempranas de la germinación de esporangiosporas de *M.rouxii*, como un abordaje preliminar para encontrar proteínas blanco de esta quinasa que permitieran luego ahondar en el entendimiento de como la PKA se activa *in vivo* y como la PKA activada induce la germinación de las esporas.

Con este objetivo se hicieron tres abordajes experimentales diferentes:

1) Análisis de proteínas fosforiladas en serina en extractos crudos de células de distintas horas de germinación, con anticuerpos antifosfoserina.

Este abordaje permitió analizar el estado de fosforilación *in vivo* de las proteínas totales fosforiladas en serina (por todas las quinastas que fosforilan en serina) durante el inicio de la germinación. En estudios de especificidad de sustrato para la PKA de *M. rouxii* utilizando péptidos sintéticos, se vió que cuando una treonina sustituía a la serina fosforilable los péptidos eran pobres sustratos de esta

PKA (Moreno, S., comunicación personal). Por lo tanto es posible que los sustratos endógenos de PKA sean principalmente fosforilados en serina. Se usó esta técnica dado las dificultades que presentaría una marcación clásica de las proteínas con $^{32}\text{PO}_4$ para analizar el perfil de proteínas fosforiladas al inocular esporas en medio de cultivo. Las esporas tienen un metabolismo disminuído y por lo tanto creemos que no se alcanzaría a equilibrar el ATP endógeno con el $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP, lo cual es imprescindible en este método.

Extractos crudos de esporas y de células de distintos tiempos de germinación (30, 60, 90 y 180 min) fueron preparados en presencia de inhibidores de fosfatasas, con el objeto de mantener las fosforilaciones endógenas. Cabe aclarar que la sensibilidad de estos anticuerpos es baja con lo cual no podemos afirmar que hemos detectado todas las proteínas fosforiladas en serina, sino mas bien aquellas que son más abundantes.

Estos extractos fueron sometidos a electroforesis en SDS-PAGE y transferidos a nitrocelulosa y los Western-blots fueron revelados con los anticuerpos mencionados.

2) Estudio de la fosforilación por PKA endógena, en esporas permeadas

En este caso se prepararon esporas permeadas, las cuales fueron incubadas con $[\gamma^{32}\text{P}]$ ATP y según se indica glucosa y cAMP. De esta manera se pudieron ver las fosforilaciones ocurridas durante la incubación en respuesta a la actividad de la PKA endógena.

3) Evaluación de posibles sustratos de PKA en extractos crudos de esporas, fraccionados por DEAE-Sepharosa mediante el agregado exógeno de subunidad catalítica de PKA.

Para esto se prepararon extractos crudos de esporas que fueron fraccionados en columnas de DEAE-Sepharosa eluidas en forma discontinua con distintas concentraciones de ClNa. Cada una de las fracciones obtenidas fue incubada con [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP y subunidad catalítica de corazón bovino o de *M.rouxii*. De esta manera se encontraron proteínas de esporas que pudieron ser fosforiladas por la subunidad catalítica de la PKA y quizás algunas de ellas tengan que ver con el inicio de la germinación.

3.4.1- Fosforilación de proteínas "in vivo" revelada con anticuerpos anti-fosfoserina.

En la figura 20 se pueden ver los resultados del revelado de los Western-blots, correspondientes a geles de 7% y 14% con anticuerpos antifosfoserina. Se observan numerosas bandas que corresponden a proteínas fosforiladas en serina.

De acuerdo a la modificación en el estado de fosforilación a lo largo de la germinación, las proteínas fueron agrupadas en tres categorías (ver tabla 5).

a) Proteínas cuya fosforilación no se modifica con el tiempo y por lo tanto se mantiene constante a lo largo de la germinación y proteínas cuya fosforilación va aumentando progresivamente con el tiempo o que se detectan en tiempos avanzados de la germinación.

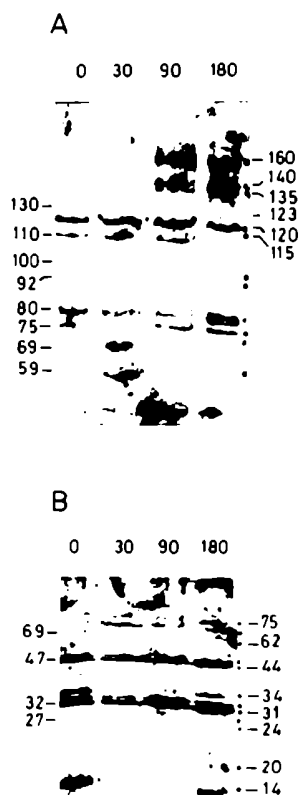


Figura 20

Fosforilaciones endógenas en extracto crudos de tiempos tempranos de germinación reveladas con anti-fosfoserina.

Extractos crudos de esporangiosporas (tiempo 0) crecidas durante 30, 90 y 180 min. en medio YPG, fueron corridos en SDS-PAGE de 7% (panel A) y 14 % (panel B) y luego transferidos en nitrocelulosa. Los western-blot fueron revelados luego con anti-fosfoserina. Están indicados los PM de las bandas correspondientes a fosfoproteínas que se modifican a lo largo del tiempo.

Las proteínas de estos dos grupos se deben ir sintetizando y fosforilando a medida que ocurre la germinación, si no se irían diluyendo con el tiempo. No parecen ser proteínas regulatorias sino más bien estructurales.

b) Proteínas que aparecen fosforiladas en forma transiente.

c) Proteínas que se desfosforilan en forma definitiva o transiente.

Las proteínas de estos dos últimos grupos fueron las de más interés dado que como su modificación en el estado de fosforilación es transitorio pueden ser proteínas regulatorias.

El perfil de fosfoproteínas que se ve a los 180 minutos no es sustancialmente diferente del visto a las 4.5 hs y 7hs, principalmente difieren en la intensidad de las bandas más que en su calidad (datos no mostrados). Esto puede deberse a que las proteínas mayoritarias son estructurales y las regulatorias por el contrario están en muy baja concentración lo que hace más difícil su detección. Estos datos están agrupados en la Tabla 5.

Destacamos entonces las proteínas de 59 y 69 kDa que se fosforilan transientemente a los 30 minutos, la proteína de 130 kDa (banda muy tenue) que se desfosforila inmediatamente de comenzada la germinación y la proteína de 34 kDa que se desfosforila transitoriamente entre los 30 y 60 minutos.

Estas proteínas que modificaron su fosforilación en forma rápida y además para algunas de ellas en forma transitoria son las mejores candidatas, entre todas las reveladas, para ser sustratos directos o indirectos de la PKA y estar involucradas en la iniciación de la germinación. De todas formas no se puede descartar que las otras proteínas cumplan alguna función en este proceso.

	Tiempo PM	0	30	90	180
Grupo a	160	+	+	++	++
	140	+	+	++	++
	135	+	+	++	++
	123	-	-	-	+
	120	+++	+++	++++	++++
	115	-	-	+	+
	95	+	+	+	+
	80	++	++	++	++
	75	++	++	++	+++
	47	++	++	++	+++
	44	++	++	++	+++
	32	+	++	++	+++
	31	+	++	+++	++++
	29	-	-	-	+
	27	-	-	-	+
Grupo b	69	-	++	-	-
	59	-	++	-	-
Grupo c	130	+	-	-	-
	110	++	++	++	+
	100	+	+	+	-
	92	+	+	+	-
	34	+++	-	-	++

Tabla 5.

Proteínas fosforiladas en serina

3.4.2- Uso de anticuerpos anti-R

Con la intención de poder identificar entre las proteínas fosforiladas a la subunidad R y conocer sus estados de fosforilación en el inicio de la germinación, se utilizaron los anticuerpos anti-R . El mismo Western-blot de la figura 20 fue revelado con este anticuerpo, de esta manera se pudo tener la seguridad de identificar por coincidencia de Rf, entre las proteínas fosforiladas en serina las que correspondían a la subunidad R (figura 21). Se revelaron tres proteínas de 72, 69 y 59 kDa. Las p-69 y la p-59 aparecen a los 30 min. Como surge de comparar las figuras 21 y 20 la fosforilación de las p-59 y p-69 está correlacionada estrechamente con la cantidad de estas proteínas. La fosforilación sólo se detectó a los 30 min que es cuando hay más cantidad.

En la figura 22 se pueden ver además, horas más avanzadas de la germinación; en este gel se sembró más cantidad de proteína y además se usó una dilución del anti-R mucho menor (1:300 cuando antes se había usado 1:1000). Se observa que la p-75, que debe ser la R nativa va aumentando con el tiempo; esto es coherente con los resultados obtenidos con las centrifugaciones en gradientes de sacarosa, en los que se vió que la subunidad R nativa va aumentando a lo largo de la germinación.

La figura 23 corresponde a un western-blot revelado con anti-R (dilución 1:300), el cual se hizo de un gel 10 % con la finalidad de poder detectar la R de esporas, cuyo PM esperamos fuera menor dado su coeficiente de sedimentación determinado en los gradientes de sacarosa. Solo con esta baja dilución del

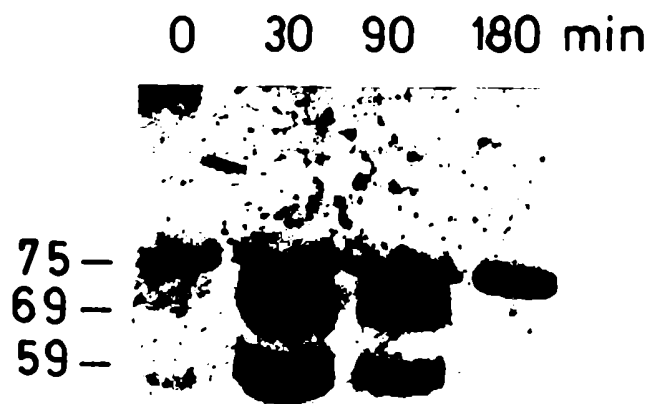


Figura 21

Subunidad R durante estadios tempranos de la germinación.

El mismo Western-blot de la figura 20 fue revelado con anti R a una dilución 1:1000 y el sistema de revelado de quimioluminiscencia. Los extractos corresponden a esporas crecidas 0, 30, 90 y 180 min. Están indicados los PM de las proteínas reveladas.

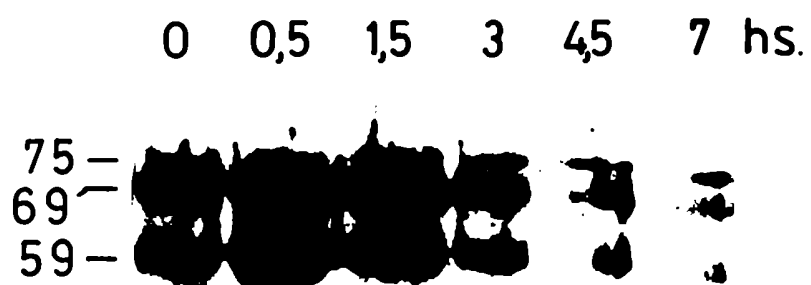


Figura 22

Subunidad R a lo largo de la germinación.

Western- blot de extractos crudos correspondientes a 0, 0.5, 1.5, 3, 4.5 y 7 hs revelado con anti-R (dilución 1:300).

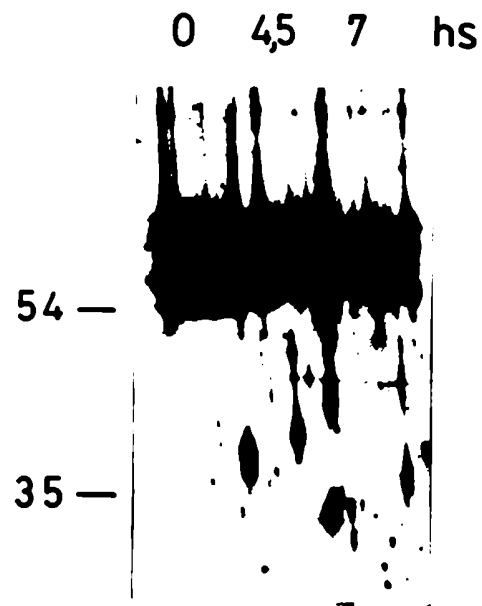


FIGURA 23

Western-blot revelado con anti-R (dilución 1:300). Las calles 1,2 y 3 corresponden a extractos crudos de esporas de tiempo 0 de germinación y 3.5 y 7 hs de germinación. Gel 10 %.

anticuerpo se detectó una banda de aproximadamente 54 kDa y otra de 35 kDa. Sin embargo dado el S de 2.7, calculando teóricamente y considerando a la proteína simétrica se esperaba encontrar una proteína de un PM aproximado de 31 kDa o ligeramente mayor si la proteína fuera asimétrica, como se considera que es la subunidad R, por lo cual creemos que la banda de 35 kDa corresponde a la R de esporas. Algo de destacar es que cuando el anticuerpo se usó en una dilución mayor (1:1000), la p-54 y la p-35 disminuyeron notablemente, mientras que las otras bandas de 59 y 69 kDa no (p-75 no se distingue por el grado de resolución del gel, aparece muy junta con p-69), como si aquellas proteínas fueran mucho menos antigénicas. Se sabe que la región más antigénica de la subunidad R es su extremo amino terminal (188).

Nosotros proponemos que la subunidad R de esporas que está proteolizada, lo estaría justamente por ese extremo, con lo cual no es ilógico entonces que tenga menos antigenicidad. Por lo tanto aunque la p-35 es la más abundante, su detección con el anticuerpo no refleja su cantidad por la falta de antigenicidad, ya que parece menos abundante que las otras proteínas reveladas.

Por qué aumentaron las p-59 y p-69 a los 30 min? Parece que provinieran de proteólisis de la especie nativa, sin embargo no se ve muy claro que haya una disminución concomitante de la especie de 72 kDa, como así tampoco parece que la suma de las cantidades de estas dos bandas sea mayor que la cantidad de p-72 presente en esporas que sería de la cual provienen.

Podemos tener en cuenta también que estas discrepancias pueden deberse a una sensibilidad muy diferente de las distintas formas de R (nativa y proteolizada) a los anticuerpos.

Hemos demostrado en este sistema que una activación de la PKA como consecuencia de un aumento transiente de cAMP provoca una depleción regulada de la subunidad C. Esta disminución en la actividad de la subunidad C no es acompañada, al menos durante la primer hora de la germinación, por una disminución en la subunidad R. Esto se evidencia por el aumento de la relación R/C. Se sabe sin embargo que existe una degradación preferencial de la subunidad R libre (no asociada a la holoenzima) como se demostró en células de linfoma S49 (213), por lo tanto podría esperarse que la subunidad R disminuyera a medida que es menor la cantidad de C.

En células de cultivos de hepatocitos el aumento en los niveles de cAMP induce una depleción de C, y como en nuestro caso se produce un aumento en la relación R/C. En este sistema se demostró que se producía además un aumento en los niveles de los mRNA de R_I y R_{II} (122). Este aumento en los mRNA permitiría un aumento en la velocidad de síntesis de la subunidad R que compensaría la supuesta degradación de R esperada. La relativa inestabilidad de R sugiere un mecanismo para coordinar los niveles relativos de las subunidades R y C (211).

En este trabajo tenemos suficiente evidencia para afirmar que la PKA de esporas, la especie R'C, se activa, pero es muy probable como hemos dicho, que también se active la holoenzima nativa aunque sea minoritaria, con lo cual

podemos esperar que se desencadene proteólisis de R como resultado de esta activación y de la depleción de C.

En base a esto podemos sospechar que las bandas correspondientes a la p-59 y la p-69 puedan ser el resultado de proteólisis de R que quedó libre después de la activación de la holoenzima, y podemos justificar la falta de disminución de la subunidad R nativa proporcional al aumento de p-59 y p-69 si pensamos que pudo haberse disparado síntesis de la subunidad nativa apenas iniciada la germinación, que compense la degradación de esta subunidad.

3.4.3- Fosforilación en esporas permeadas

Esporas permeadas fueron incubadas directamente con [γ P³²]ATP en presencia y ausencia de cAMP, o primero fueron preincubadas con glucosa, ATP-Mg, y luego incubadas con el [γ ³²P]ATP, en presencia o ausencia de cAMP. La preincubación se hizo con el fin de remedar el estímulo de glucosa que ocurre al germinar las esporas en medio rico, que contiene este azúcar como fuente de carbono. Como ya hemos dicho, en esporangiosporas de ciertos zigomicetes, entre ellos *M.rouxii*, la inducción de la germinación por glucosa se asocia con un rápido pero transiente aumento en los niveles de cAMP, el cual dispara una cascada de fosforilaciones proteicas (146, 147). Aparentemente existe un mecanismo regulatorio específico en la inducción de la señal de cAMP por la glucosa, que actuaría como molécula efectora, interactuando estereoespecíficamente con ciertas proteínas regulatorias para disparar los eventos de la germinación.

El perfil de las fosfoproteínas obtenido por SDS-PAGE y autorradiografía, correspondiente a estas esporas se ve en la figura 24.

Sin preincubación, el perfil de fosfoproteínas no varía cuando la incubación se realiza en presencia o ausencia de cAMP. Cuando las células permeadas se preincuban con glucosa y ATP-Mg, se observan dos diferencias importantes: primero la aparición de dos fosfoproteínas de 59 y 69 kDa, tanto en presencia como en ausencia de cAMP y segundo, la aparición de dos fosfoproteínas de 48 y 115 kDa cuya fosforilación es dependiente de cAMP.

Es posible que las p-59 y p-69 correspondan a las formas proteolizadas de la subunidad R descritas en el punto anterior.

Por qué las proteínas p-48 y p-115 aparecen fosforiladas después de preincubar con glucosa, ATP-Mg, y luego el agregado de cAMP y no con el agregado de cAMP solo, sin la preincubación?. Hay varias posibles explicaciones: Durante la preincubación la PKA sufriría alguna modificación (como por ejemplo fosforilación, defosforilación, proteólisis, etc.) que la haría luego activable por cAMP. También podemos pensar que son los sustratos los que sufrieron alguna modificación que los hace susceptibles a la fosforilación por PKA.

Como una explicación poco probable podemos pensar que el cAMP exógeno agregado no sea suficiente para activar la PKA y que el cAMP que se pudiera haber sintetizado "in situ" por la influencia de la estimulación con glucosa del sistema de la adenilato ciclasa, contribuyera notablemente a la activación.

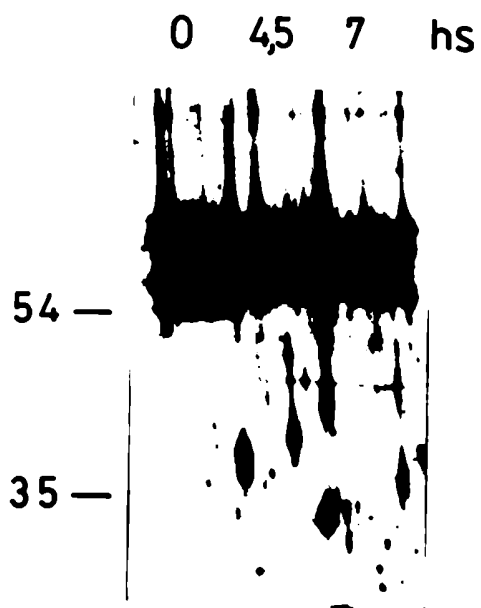


Figura 24

Fosforilación endógena en células permeadas.

Esporangiosporas de *M.rouxii*, fueron permeadas y preincubadas con o sin glucosa durante 5 minutos, y luego se agregó [γ ³²P]ATP en presencia o ausencia de cAMP. Están indicados los PM de las bandas correspondientes a proteínas que sufren modificaciones por los tratamientos.

3.4.4- Fosforilaciones con subunidad C exógena

En este abordaje las fracciones obtenidas por fraccionamiento de un extracto de esporas a través de DEAE-Sepharosa, fueron incubadas con subunidad catalítica de corazón bovino. Luego se analizó el perfil de fosfoproteínas de los extractos por SDS-PAGE 7% y 14% y autorradiografía.

Comparando los perfiles obtenidos sin y con el agregado de la subunidad C y [γ ^{32}P] ATP (figura 25), se pudieron diferenciar varios grupos de fosfoproteínas:

- 1) Proteínas cuya fosforilación es independiente del agregado de la subunidad catalítica,
- 2) Proteínas cuya fosforilación aumenta con la subunidad C,
- 3) Proteínas que aparecen fosforiladas por el agregado de C y
- 4) Proteínas que se desfosforilan (ver mas adelante) al agregar C.

En la figura están marcadas algunas bandas correspondientes a proteínas que se comportan de alguna de las formas enunciadas anteriormente al agregar subunidad C.

Muchas de las proteínas que no se han destacado corresponden a proteínas cuya fosforilación no se modifica notoriamente por el agregado de subunidad catalítica.

Se han obtenido resultados muy similares (datos no mostrados), cuando se utilizó subunidad C de *M.rouxii* como fuente de PKA exógena.

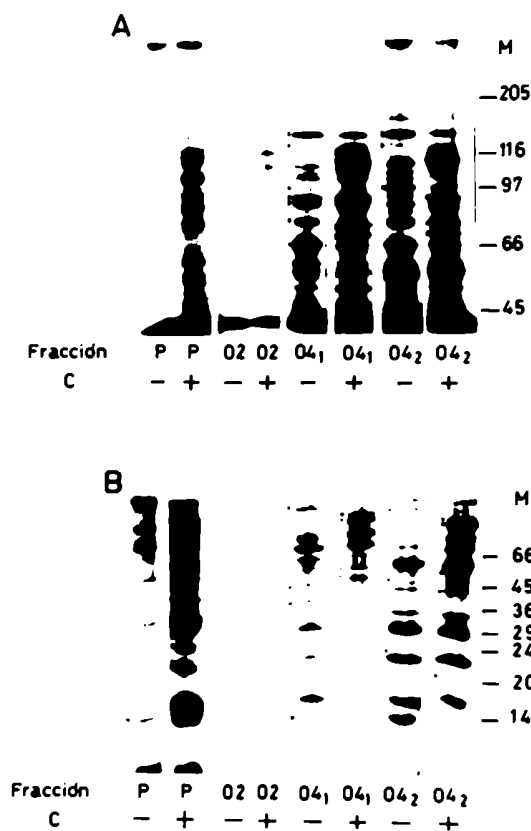


Figura 25

Fosforilación de proteínas de extractos de esporangiosporas con subunidad C exógena de corazón bovino.

En el panel A se muestra la autorradiografía correspondiente a un SDS-PAGE 7%, y en el panel B a un 14%. Extractos crudos de esporangiosporas fueron fraccionados por DEAE-Sepharosa con 0.2 y 0.4 M ClNa, también se muestra la fracción correspondiente al percolado (P). Las fracciones fueron luego sometidas a fosforilación con subunidad C de corazón bovino y finalmente corridas en los geles.

Los puntos indican las proteínas que han sufrido modificación por el agregado de C.

3.5- INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

Para que una proteína sea regulada por fosforilación, las actividades máximas de las quinasas y de las fosfatasas de proteínas que actúen sobre una proteína particular deben estar balanceadas; de otra manera la proteína estaría completamente fosforilada o completamente defosforilada. La actividad catalítica de la mayoría de las serina quinasas y de las serina fosfatasas son similares (26). En principio esto permitiría el balance entre las dos actividades; sin embargo, hay que tener en cuenta la gran importancia que tienen las afinidades por los sustratos junto con la localización subcelular tanto de los sustratos como de las fosfatasas y quinasas. Este balance de actividades puede ser desplazado hacia un lado u otro por distintas causas. En este caso las proteínas que disminuyen su fosforilación o que se "desfosforilan", en respuesta a una señal de cAMP, pueden ser el resultado de la inhibición de la actividad de una quinasa por fosforilación mediada por PKA o por el aumento de la actividad de una fosfatasa por PKA. Hay que tener en cuenta además que la desaparición de bandas no necesariamente implican defosforilación de las proteínas, sino que esa desaparición puede deberse a un aumento en el número de sitios fosforilados que provoque un cambio de la movilidad electroforética, o bien ser el resultado de proteólisis desencadenada por la actividad de una proteasa activada por la PKA.

Tratar de comparar puntualmente los resultados obtenidos con los tres abordajes experimentales es difícil, ya que el único parámetro que permite identificar a las proteínas es su peso molecular, el cual no es totalmente exacto.

Sin embargo podemos sacar algunas conclusiones útiles, que permiten diseñar un futuro abordaje experimental de este problema.

De la detección de proteínas fosforiladas en serina in vivo, concluimos que en líneas generales, el método es muy poco sensible y que las proteínas que se visualizan probablemente sean las que constitutivamente se encuentran fosforiladas. Sin embargo hay dos puntos muy interesantes que se rescatan: 1) la aparición de dos bandas fosforiladas, producto de proteólisis de la subunidad R, que reflejan una modificación en la PKA que ocurre muy temprano en el inicio de la germinación y 2) la desaparición de dos proteínas fosforiladas, también al inicio de la germinación, una banda de 115 kDa (muy tenue) y una muy importante de 34 kDa. Será interesante investigar si esta desaparición depende de la activación de la PKA. En este momento, estamos investigando en el laboratorio la existencia de compuestos o análogos de cAMP que puedan comportarse como inhibidores de PKA o antagonistas del cAMP con los cuales realizar estudios in vivo.

Del abordaje de esporas permeadas, podemos rescatar dos puntos interesantes para seguir profundizando: 1) la aparición de las dos bandas de 69 y 59 kDa por preincubación con glucosa y ATP/Mg; es muy probable, aunque no lo hemos probado aún, que estas dos bandas correspondan a los mismos dos productos de proteólisis de subunidad R detectados con el primer abordaje; 2) la sensibilidad del sistema a la estimulación por cAMP luego de la preincubación con glucosa y ATP/Mg. Este sistema, en que se pueden controlar a voluntad los agregados externos, nos permitirá acercarnos a dilucidar, porqué se produce la aparición de los productos de proteólisis de R y si es una modificación de la PKA o

de los sustratos lo que hace que la enzima sea activable por cAMP, o que los sustratos sean fosforilables por PKA luego de una preincubación, en la cual aún no sabemos, si lo importante es la glucosa, el ATP/Mg o ambos compuestos.

Del último abordaje experimental: fosforilación de proteínas in vitro por agregado de subunidad catalítica de PKA podemos también sacar conclusiones para una futura investigación. Por un lado, vemos que hay numerosos potenciales sustratos de PKA en esporas de *M. rouxii*, que podrán ser caracterizados con más detalle analizando su perfil en geles bidimensionales, luego de haber hecho el extracto en condiciones de mantener su estado de fosforilación y luego de haber forzado la defosforilación de las mismas. Pero más interesante aún es el hecho de haber encontrado en este sistema in vitro, la disminución en la intensidad y hasta la desaparición de bandas fosforiladas, por agregado de subunidad C. Dentro de estas bandas, casualmente se encuentran dos con pesos moleculares similares a las de 115 y 34 kDa que describiéramos en el sistema in vivo. Con este sistema in vitro, podremos dilucidar cuales de las alternativas que hemos planteado para la explicación de este fenómeno es la que está ocurriendo: modificación en el número de sitios fosforilables y cambio en su movilidad electroforética, proteólisis y consecuente cambio en su movilidad por activación de una proteasa, o corrimiento del equilibrio quinasa -fosfatasa hacia la actividad defosforilante por activación de una fosfatasa de proteína mediada por PKA. Cabe destacar que ya han sido descritas dos proteínas fosfatasas en micelio de *M. rouxii* (212-213). Esto nos permita quizás entender la desaparición de algunas bandas de proteínas fosforiladas en el sistema in vivo.

CONCLUSIONES

En esporas de *M. rouxii* existe una actividad quinasa dependiente de cAMP, en forma de una holoenzima de 5.5 S, que denominamos RⁿC. Su actividad está aparentemente inhibida por un exceso de subunidad R, la cual es también menor que la R nativa y tiene un S de 2.7. La especie proteolizada de R (R') puede inhibir a la subunidad C y también unir cAMP; provendría de proteólisis endógena de la subunidad R nativa del lado amino terminal de la molécula.

La PKA se activa muy pronto después de iniciada la germinación, y por lo tanto tendría un rol importante en el inicio de la misma. Como consecuencia de la activación de PKA, ocurrida por un aumento transiente de cAMP, se produce una depleción regulada de la subunidad C. Esto indicaría que la especie RⁿC es fisiológicamente activa. Esta especie no parece ser sintetizada una vez iniciada la germinación, sino que la especie que aparece luego por síntesis sería la holoenzima nativa tetramérica. Tenemos por lo tanto suficiente evidencia para asociar variaciones de PKA con el desarrollo de *M. rouxii*

En un intento por identificar sustratos de la PKA hemos encontrado que uno de los sustratos de esta enzima es la propia subunidad R, y por lo tanto decimos que la R de la PKA de *M. rouxii* se autofosforila. Esta autofosforilación produce una disminución en la interacción entre R y C, favoreciendo el proceso de activación y disociación por cAMP. También se han encontrado proteínas que modifican su fosforilación en forma rápida, algunas de ellas lo hacen de forma transitoria, durante los estadios tempranos de la germinación. Estas proteínas podrían ser sustratos de PKA y estar involucradas en el inicio de la germinación. Las proteínas encontradas son p-130, p-115, p-69, p-59, p-47 y p-34.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Sutherland, E.W. y Rawll, T.W., (1957), *J. Am. Chem. Soc.* 79: 3608-
- 2- Robinson, S.A.; Butcher, R.W. y Sutherland, E.W., (1971), *Academic. Press.*
New York.
- 3- Botsford, J.L., (1981), *Microbiol. Rev.* 45: 620-642.
- 4- Pall, M.L., (1981), *Microbiol. Rev.* 45: 462 - 480.
- 5- Gilman, A.G., (1987), *Ann. Rev. Biochem.* 56: 615 - 649.
- 6- Taussig, R. y Gilman, A.G., (1995), *J. Biol. Chem.* 270: 1 - 4.
- 7- Tang, W. y Gilman, A. G., (1992), *Cell* 70: 869 - 872.
- 8- Tao, M. y Lipmann, F., (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63: 86 -
- 9- Ladant, D., (1988), *J. Biol. Chem.* 263: 1612 - 2618.
- 10- Bianchini, G.; Pastini, A.; Muschietti, J.; Téllez-Iñon, M.T.; Torres, H. y Flawiá, M., (1990), *Biochim. Biophys. Acta* 1055: 75 - 81.
- 11- Hidaka, H.; Hayashi, H.; Kohri, H.; Kimura, Y.; Hosokawa, T.; Igawa, T. y Saitoh, Y., (1979), *J.Pharmacol. Experimental Therapeutics* 211: 26 - 30.
- 12- Kachatrian, L.; Howlett, A. y Klein, C., (1987), *J. Biol. Chem.* 262: 8071 - 8076.
- 13- Katoaka, T.; Broek, D. y Wigler, M. (1985), *Cell* 43: 493 - 505.
- 14- Flawiá, M. y Torres, H. (1972), *J. Biol. Chem.* 217: 6873 - 6879.
- 15- Flawiá, M. y Torres, H. (1972), *J. Biol. Chem.* 217: 6880 - 6883.
- 16- Cantore, M.L.; Galvagno, M.A. y Passeron, S., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.* 199: 312 - 320.
- 17- Paveto, M.C; Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167: 1177-1181.

- 18- Egidy, G.; Paveto, M.C.; Passeron, S. y Galvagno, M.A., (1990), *Cell. Biol. Int. Reports* 14: 59 - 68.
- 19- Torruella, M.; Flawiá, M.; Eisenschlos, C.; Molina y Vedia, L.; Rubinstein, C. y Torres, H. (1986), *Biochem. J.* 234: 145 - 150.
- 20- Coso, O., (1993), Tesis Doctoral FCEyN, UBA
- 21- Carricarte, V.; Bianchini, G.; Muschietti, J.; Téllez Iñón, T.; Rubinstein, C. y Torres, H. (1988), *Biochem. J.* 249: 807 - 811.
- 22- Tang, W-J. y Gilman, A. (1992), *Cell* 70: 869 - 872.
- 23- Katoaka, T.; Broek, D. y Wigler, M. (1985) *Cell* 43: 493 - 505.
- 24- Harper, J.F.; Haddox, M.K.; Johanson, R.; Hanley, R.M. y Steiner, A.L. (1985), *Vitam. Horm.* 42:197 - 252.
- 25- Scott, J.D., y McCartney, S., (1994), *Mol. Endocrinol.* 8: 5 - 11.
- 26- Cohen, S. (1992), *Trends. Biochem. Sci.* 17: 408 - 413.
- 27- Shenolikar, S., (1987), *J. Cyc. Nucl. Prot. Phos. Res.* 11: 531 - 541.
- 28- Ulloa, R., Tesis Doctoral (1988)
- 29- Beavo, J.H.; Hansen, R.S.; Harrison, S.A.; Hurwitz, R.L.; Martins, T.I. y Mumby, M.D., (1982), *Mol. Cel. Endocrinol.* 28: 387 - 410.
- 30- Shimoyama, M.M.; Kawai, M.; Tanigawa, Y. y Vedo, I. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47: 59 - 65.
- 31- Appleman, M.M.; Thompson, W.J. y Russell, T.R. (1973), *Adv. Cyc. Nucl. Res.* 3: 65 - 98.
- 32- Londesborough, J. y Suoranta, K. (1988), *Method. Enzymol.* 159: 777 - 786.

- 33- Egidy, G.; Paveto, C.; Passeron, S. y Galvagno, M.A., (1990), *Exp. Mycol.* 13: 428 - 432.
- 34- Maia, J.C. y Camargo, E., (1974), *Cell. Differ.* 3: 147 - 155.
- 35- Galvagno, M.A.; Forchiassin, F.; Cantore, M.L. y Passeron, S., (1984), *Exp. Mycol.* 8: 334 - 341.
- 36- Galvagno, M.A.; Moreno, S.; Cantore, M.L. y Passeron, S., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 779 - 785.
- 37- Moreno, S.; Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1982). *Arch. Biochem. Biophys.* 214: 573 - 580.
- 38- Hardie, D.G. *Protein Phosphorylation. The Practical Approach Series.* Editor: Rickwood, D. y Hames, B.D. Oxford University Press (1993).
- 39- Ihagaki, N.; Ito, M.; Nakano, T. y Inagaki, M., (1994) *Trends Biochem. Sci.*, 19: 439 - 518.
- 40- Hunter, T., (1987), *Cell* 50: 823 - 829.
- 41- Hunter, T., (1995), *Cell* 80 :225 - 236.
- 42- Krebs, E.G.; Graves, D.J. y Fischer, E.H., (1959), 234: 2867 - 2873.
- 43- Walsh, D.A.; Perkins, J.P. y Krebs, E.G., (1968), *J. Biol. Chem.* 243: 3763 - 3765.
- 44- Erikson, R.L.; Collett, M.S.; Erikson, E. y Purchio, A.F., (1979), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76: 6260 - 6264..
- 45- Cohen, S.; Ushiro, H.; Stoscheck, C. y Chinkers, M. (1982), *J. Biol. Chem.* 257: 1523 - 1531.
- 46- Swarson, R.; Alex, L. y Simon, M., (1994), *Trends Biochem. Sci.* 19:485 - 490.

- 47- Taylor, S.S.; Buechler, J.A. y Knigton, D., (1990), Peptides and Phosphorylation , Kemp, B. E. , Crit. Rev. Biochem. 1 - 41.
- 48- Bertics, P.J. y Gill, G.N., (1985), J. Biol. Cell, 260: 14642-
- 49- Klein, P.S.; Sun, T.J.; Saxe, C.L.; Kimmel, A.R.; Johnson, R.L. y Devreotes, P.N., (1988). Science 241: 1467 - 1472.
- 50- Hokberger, P E. y Swandulla, D., (1987), Cell. Molec. Neurobiol. 7: 229 - 241.
- 51- Beebe, S.j. y Corbin, J.D. The Enzymes: Control by phosphorylation, part A vol: 77; eds. New York, Academic 1986:43 - 111.
- 52- Peters, K.A.; Demaille, J.G.; Fisher, E.H., (1977), Biochemistry 16: 5691 - 5697.
- 53- Sugden, P.H.; Holliday, L.A.; Reimann, E.M. y Corbin, J.D., (1976), Biochem.J. 149: 409 - 422.
- 54- Shoji, S.; Ericsson, L.H., Walsh, K.A.; Fisher, E.H. y Titani, K., (1983), Biochemistry 22: 3702-3709.
- 55- Lee, D.C.; Carmichael, D.F.; Krebs, E.G. y McKnight, G.S., (1983), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80: 3608 - 3612.
- 56- Showers, M.O. y Mauer, R.A., (1986), J. Biol. Chem. 261: 15360 - 15361.
- 57- Hedin, L.; McKnight, G.S.; Lifka, J.; Durica, J.O. y Richards, J.S., (1989), Endocrinology 120: 1928 - 1935.
- 58- Beebe, S.; Øyen, O.; Sandberg, M.; Frøysa, A.; Hansson, V. y Jahnsen, T., (1990), Mol. Endocrinol. 4: 465 - 475.
- 59- Scott, J.D., (1991), Pharmac. Ther. 50: 123 - 145.

- 60- Toda, T.; Cameron, S.; Sass, P.; Zoller, M. y Wigler, M., (1987) *Cell* 50: 277 - 287.
- 61- Toda, T.; Cameron, S.; Sass, P.; Zoller, M.; Scott, J.D.; McMullen, B.; Hurwitz, M.; Krebs, E.G. y Wigler, M. (1987), *Molec. Cell. Biol.* 7: 1371- 1377.
- 62- Hanks, S.K.; Quinn, A.M. y Hunter, T., (1988), *Science* 241: 42 - 52.
- 63- Zoller, M.J. y Taylor, S.S, (1979), *J. Biol. Chem* 254:8363 - 8368.
- 64- Buechler, J.A; Vedvick, T.A. y Taylor, S.S., (1989), *Biochemistry* 28: 3018 - 3024.
- 65- Puri, R.N.; Bhatnagar, D. y Roskoski, R. (1985), *Biochemistry* 24: 6499 - 6508.
- 66- Granot, J.; Mildvan, A.S. y Kaiser, E.T. (1980), *Arch. Biochem. Biophys.* 205:1 - 17.
- 67- Buechler, J.A. y Taylor, S.S., (1988), *Biochemistry* 27: 7356 - 7361.
- 68- Buechler, J.A. y Taylor, S.S., (1990), *Biochemistry* 29: 1937 - 1943.
- 69- Mosbashery, S. y Kaiser, E.T., (1988), *Biochemistry* 27: 3691 - 3696.
- 70- Levin, L.R.; Kuret, J.; Johnson, K.E.; Power, S.S; Cameron, S.; Michaeli, T.; Wigler, M. y Zoller, M.J., (1988), *Science* 240: 68 - 70.
- 71- Levin, L.R. y Zoller, M.J., (1990), *Molec. Cell. Biol.* 10: 1066 - 1075.
- 72- Cox, S. y Taylor, S.S., *J. Biol. Chem.*, 269: 22614 - 22622.
- 73- Shoji, S.; Ericsson, L.H.; Walsh, K.A.; Fisher, E.H. y Titani K (1983), *Biochemistry* 22: 3702 - 3709.
- 74- Steinberg, R.; Cauthron, R.; Symcox, M. y Shuntoh, H. (1993), *Molec. and Cell. Biology.* 13: 2332 - 2341.

- 75- Toner-Webb, J.; Van Patten, S.; Walsh, D. y Taylor, S.S., (1992), J. Biol. Chem. 267: 25174 - 25180.
- 76- Corbin, J.D., Keely, S.L y Park, C.R., (1975), J. Biol. Chem. 250: 218 - 225.
- 77- Rosen, O.M. y Erlichman, J., (1975), J. Biol. Chem. 250: 7788 - 7794.
- 78- Hoffmann, F.; Beavo, J.A.; Betchel, P. y Krebs, E.G., (1975), 250: 7795 - 7801.
- 79- Lee, D.C.; Carmichael, D.F.; Krebs, E.G. y McKnight, G.S., (1983), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80: 3608 - 3612.
- 80- Scott, J.B.; Glaccum, M.B.; Zoller, M.J.; Unhler, M.D. y Helfman, D.M., (1987), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84: 5192 - 5197.
- 81- Clegg, C.H.; Codd, G.G. y McKnight, G.S., (1988), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85: 3703-3707.
- 82- Jahnsen, T.; Hedin, L.; Kidd, V.J.; Beattie, W.G. y Lohmann, S.M. (1986), J. Biol. Chem. 261: 12352 - 12361.
- 83- Hashimoto, E.; Takio, K. y Krebs, E.G., (1981), J. Biol. Chem. 256: 5604 - 5607.
- 84- Rangel-Aldao, R. y Rosen, O.,(1977), J. Biol. Chem. 252: 7140 - 7145.
- 85- Hemmings, B.A.; Aitken, A., Cohen, P, Rymond, M. y Hofmann, F. (1982), Eur. J. Biochem. 127: 473 - 481.
- 86- Silberstein, S., Cantore, M.L.; Galvagno, M.A. y Passeron, S. , (1990), Arch. Biochem. Biophys. 282: 132 - 140.
- 87- Mutzel, R.; Lacombe, M.; Simon, M.N; Degunzburg, J. y Veron, M., (1987), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84: 6 - 10.
- 88- Zick, S. y Taylor, S.S., (1982), J. Biol. Chem. 257: 2287 - 2293.

- 89- Potter, R.L.; Sttaford, P.H. y Taylor, S.S., (1978), Arch. Biochem. Biophys. 190: 174 - 180.
- 90- Reimann, E.M. (1986), Biochemistry 25: 119 - 125.
- 91- Cupp, J.R.; Vitalis, E.A. y Scott, J.D., (1989), The Protein Society, Proc. 3rd Symp. Abstr. T 141.
- 92- Scott, J.D.; Stofko, R.E.; McDonald, J.R.; Comer, J.D.; Vitalis, E.A. y Mangilis, J., (1990), J. Biol. Chem. 265: 21561 - 21566.
- 93- Rubin, C.S.; Rangel-ALdao, R.; Sarkar, D.; Erlichman, J. y Fleischer, N. (1979), J. Biol. Chem. 254: 3797 - 3805.
- 94- Coghlan, V.M.; Bergeson, S.E.; Langerber, L.; Nilaver, G. y Scott, J.D., (1993), Mol. Cell. Biochem. 128: 309 - 319.
- 95- Bregman, D.B.; Battacharya, N. y Rubin, C.S., (1989), J. Biol. Chem. 264: 8183- 8189.
- 96- Carr, D.W.; Stofko-Hahn, R.E., Fraser, I.D.C., Bishop, S.M.; Acott, T.S., Brennan, R.G y Scott, J.D. (1991), J. Biol. Chem. 266: 14188 - 14192.
- 97- Corbin, J.D.; Sugden, P.H.; West, L.; Fockhard, D.A.; Lincoln, T.M. y McCarthy, D., (1978), J. Biol. Chem. 253: 3997 - 4003.
- 98- Takio, K.; Smith, S.B.; Krebs, E.G.; Walsh, K.A. y Titani, K., (1984), Biochemistry 23: 4200 - 4206.
- 99- Mumby, M.C., Weldon, S.L., Scott, C.W. y Taylor, S.S., (1985), Pharmacol. Ther. 28: 367-387.
- 100- Buechler, Y.J.; Herberg, F.W. y Taylor, S.S., (1993), J. Biol. Chem. 268: 16495 - 16503.

- 101- Walsh, D.A.; Ashby, C.D.; Gonzalez, C.; Calkins, D.; Fisher, E.H. y Krebs, E.G. (1971), *J. Biol. Chem.* 246: 1977 - 1985.
- 102- Whitehouse, S. y Walsh, D.A. (1982), *J. Biol. Chem.* 257: 6028 - 6032.
- 103- Shabb, J. y Corbin, J. (1992), *J. Biol. Chem.* 267: 5723 - 5726.
- 104- Døskeland, S.O. y Øgreid, D.(1984), *J. Biol. Chem.* 259: 2291 - 3201.
- 105- Weber, I.T.; Takio, K.; Titani, K. y Steitz, T.A., (1982), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79: 7679 - 7683.
- 106- Døskeland, S.O.; Maronde, E. y Gjertsen, B., (1993), *Bioch. Biophys. Acta* 1178: 249 - 259.
- 107- Lanagan, T.A., (1973), *Adv. Cyclic. Nucleotide. Res.* 3: 99 -
- 108- Kemp, B.E.; Bylund, D.B.; Huang, T.S. y Krebs, E.G., (1975), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72:3448 -
- 109- Humble, E.; Berglund, L.; Titanji, V.; Ljungström, O.; Edlund, B.; Zetterqvist, Ö. y Engström, L., (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66: 614 -
- 110- Kemp, B.E.; Benjamini, E. y Krebs, E.G., (1976), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 73: 1038 - 1042.
- 111- Kemp, B.E.; Graves, D.J., Benjamini, E. y Krebs, E.G., (1977), *J. Biol. Chem.* 252: 4888 -
- 112- Knighton, D.R.; Zheng, J.; Ten Eyck, L.F. ; Xoung, N., Taylor, S.S. y Sowadski, J.M., (1991), *Science* 253: 407 -414.
- 113- Adams, J.A. y Taylor, S.S (1993), *J. Biol. Chem.* 268: 7747 - 7752.
- 114- Krebs, E.G. y Beavo, J.A., (1979), *Annu. Rev. Biochem.* 48: 923 -

- 115- Fantozzi, D.; Harootunian, A.; Wen, W.; Taylor S.S.; Feramisco, J.; Tsien, R. y Mein Kothy, J., (1994), *J. Biol. Chem.* 269: 2676 - 2686.
- 116- Corbin, J.D.; Keely, S.L. y Park, C.R., (1975), *J. Biol. Chem.* 250: 218 - 225.
- 117- Russel, D.H., (1978), *Adv. Cyclic. Nucleotides. Res.* 4: 311 - 321.
- 118- Ekanger, R.; Vintermyr, O.K.; Houge, G.; Sand, T.E.; Scott, J.D.; Krebs, E.G.; Eikitom, T.; Christoffersen, T.; Øgreid, D. y Døskeland, S.O., (1990), *Mol. Endocrinol.* 4: 481-488.
- 119- Gross, R.E.; Rubin, C.S., (1990), *J. Biol. Chem.* 260: 6296-
- 120- Landmark, B.F.; Fauske, B.; Esklid, W.; Skalhegg, B.; Lohmann, S.M.; Hansson, V.; Jahnsen, T. y Beebe, S.J. (1991), *Endocrinology* 129: 2345 - 2354.
- 121- Alhanaty, E. y Shaltiel, S., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 323 - 332.
- 122- Houge, G.; Vintermyr, O.K. y Døskeland, S.O., (1990), *Mol. Endocrinol.* 4: 481 - 488.
- 123- Taskén, K.A.; Knutsen, H.K.; Attramadal, H.; Taskén, K; Jahnsen, T.; Hansson, V. y Esklid, W. (1991). *Molec. Endocrinol.* 28: 21 - 28.
- 124- Jackiw, V. y Hunzicker-Dunn, D., (1992), *J. Biol. Chem.* 267: 14335 - 14344.
- 125- Steimberg, R.A. y Agard, D.A., (1981), *J. Biol. Chem.* 256: 10731 - 10734.
- 126- Pastori, R.; Moreno, S. y Passeron, S., (1985), *Mol. Cell. Biochem.* 69: 55 - 66.
- 127- Paveto, C.; Passeron, S.; Corbin, J. y Moreno, S., (1989), *Eur. J. Biochem.* 179: 429 - 434.
- 128- Moreno, S. y Passeron, S. (1980), *Arch. Biochem. Biophys.* 199: 321 - 330.

- 129- Pastori, R.; Kerner, N.; Moreno, S. y Passeron, S., (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 663 - 671.
- 130- Guthmann, M.; Pastori, R. y Moreno, S., (1990), *Cellular Signalling* 2: 395 - 402.
- 131- Paveto, M.C., (1987), Tesis Doctoral, FCEyN (UBA).
- 132- Toda, T.; Cameron, S.; Sass, P.; Zoller, M. Scott, J.D.; McMullen, B.; Hurwitz, M.; Krebs, E.G.; Wigler, M., (1987), *Mol. Cell. Biol.* 7:1371 - 1377.
- 133- Mutzel, R.; Lacombe, M.L.; Simon, M.N.; Gunzburg, J. y Veron, M., (1987), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84:6 - 10.
- 134- Lu, X.; Gross, R.E.; Bagchi, S. y Rubin, C.S. (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 3293 - 3303.
- 135- Marques, M.V. y Gomes, S.L., (1992), *J. Biol. Chem.* 267: 17201 - 17207.
- 136- Gold, S.; Duncan, G.; Barret, K. y Kronstad, J., (1994), *Genes & Development* 8: 2805 - 2816.
- 137- Gross, R.E.; Bagchi, S.; lu, X. y Rubin, C.S. (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 6896 - 6907.
- 138- Oliveira, J.C.F.D.; Borges, A.C.C.; Maerques, M.D. y Gomes S.L., (1994), *Eur. J. Biochem.* 219: 1 - 2.
- 139- Toda, T.; Cameron, S.; Sass, P.; Zoller, M. y Wigler, M., (1987), *Cell* 50: 277 - 287.
- 140- Glikin, G.; Judewicz, N. y Torres, H.N., (1982), *Mol. Cell. Biochem.* 46: 121 -
- 141- Ulloa, R.; Mesri, E.; Esteva, M., Torres, H.N. y Tellez- Iñón, M.T., (1988), *Biochem. J.* 255: 319 -

- 142- Kerner, N. y Passeron, S., (1984), *Mol. Cell. Biochem.* 60: 115 -
- 143- Hoechststrasser, M.; Nelson, D.L., (1989), *J. Biol. Chem.* 264: 14510 -
- 144- Ishikawa, T., (1989), *Bot. Mag. Tokyo* 102: 471 - 490.
- 145- Matsumoto, K.; Uno, I. y Ishikawa, T., (1983), *Cell* 32: 417 - 423.
- 146- Van Laere A.J., (1986), *Exp. Mycol.* 10: 52 - 59.
- 147- Van Mulders, R.M. y Van Laere, A.J. (1984), *J. Gen. Microbiol.* 130: 541 - 547.
- 148- Chattaway, F.W.; Wheeler, P.R. y O'Reilly, J., (1981), *J. Gen. Microbiol.* 123: 233 - 240.
- 149- Vale, V.L.; Gomes, S.L; Maia, J.C y Mennucci, L., (1976), *FEBS lett.* 67: 189 - 192.
- 150- Gomes, S.L.; Mennucci, L. y Maia, J.C., (1980), *Cell. Different.* 9: 169 - 179.
- 151- Sypherd, P.S.; Borgia, P.T. y Paznokas, J.L., (1978), *Adv. Microb. Physiol.* 18: 67 - 104.
- 152- Bartniki-Garcia, S., (1963), *Bacteriol. Rev.* 27: 293 - 304.
- 153- Orlowski, M., (1991), *Microbiological Reviews* 55: 234 - 258.
- 154- Paveto, M.C.; Epstein, A. y Passeron, S., (1975), *Arch. Biochem. Biophys.* 169: 93 - 101.
- 155- Pereyra, E.N.; Zaremborg, V. y Moreno, S., (1992), *Exp. Mycol.* 16: 93 - 101.
- 156- Cantore, M.L.; Galvagno, M.A. y Passeron, S., (1983), *Cell. Biol. Int. Rep.* 7: 947 - 954.
- 157- Paznokas, J.L. y Sypherd, P.S., (1975), *J. Bacteriol.* 124: 134 - 139.
- 158- Orlowski, M., (1980), *Arch. Microbiol.* 126: 133 - 140.

- 159- Dewerchin, M.A. y Van Laere, A.J., (1984), *J. Bacteriol.* 158: 575 - 579.
- 160- Tomes, C. y Moreno, S. (1990), *Exper. Mycol.* 14: 78 - 83.
- 161- Haidle, C.W. y Storck, R., (1966), *J. Bacteriol.* 92: 1236 - 1244.
- 162- Bartnicki-Garcia, S. y Nickerson, W.J., (1962), 83: 841 - 858.
- 163- Pardo, P. y Moreno, S., (1988), *Second Messengers Phosphoproteins* 12: 183 - 196.
- 164- Rannel, S.R.; Beasley, A.; Corbin, J.D. , (1983), *Methods Enzymol.* 99: 55 -62.
- 165- Roskoski, R. (1983), *Methods Enzymol.* 99: 168 - 175.
- 165'- Steiner, A.L.; Parker, C.W. y Kipnis, D.M., (1972), *J. Biol. Chem.* 247: 1106 - 1113.
- 166- Moreno, S.; Pastori, R. y Passeron, S. (1983), *Mol. Cell. Biochem.* 52: 13 - 16..
- 167- Maggese, M.C.; Galvagno, M.A.; Cantore, M.L. y Passeron, S. (1982), *Cell. Biol. Intl. Rep.* 6: 1101 - 1108.
- 168- Knudsen, K.A. (1985 - *Analyt. Biochem.* 147: 285 - 288.
- 169- Diano, M.; Lebiviki, A. y Hirn, M., (1987), *Analyt. Biochem.* 166: 224 - 229.
- 170- Paveto, C.; Passeron, S. ; Corbin, J. D. y Moreno, S. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179: 429 - 434.
- 171- Laemmli, U.K., (1970), *Nature, Lond.* 227: 680 - 685.
- 172- *Worthington Enzyme Manual* (1972), *Worthington Biochemical Corp.*, Freenold, New Jersey.
- 173- Bradford, M. (1976), *Anal. Biochem.* 72: 248 -

- 174- Lowry, O.H., Roseborough, N.J.; Farr, A. y Randall, R., (1951), J. Biol. Chem. 193: 265 - 275.
- 175- Ekanger, R.; Vintermyr, O.; Houget, G.; Sand, T.; Scott, J.; Krebs, E.G.; Eikhom, T.; Christoffersen, T.; Øgreid, D. y Døskeland, S., (1989), J. Biol. Chem. 264: 4374 - 4382.
- 176- Kuret, J.; Johnson, K.; Nicolette, C. y Zoller, M.Jj, (1988), J. Biol. Chem. 263: 9149 - 9154.
- 177- Beavo, J.A.; Betchel, P.J. y Krebs, E.G. , (1974), Proc. Natd. Acad. Sci. USA. 71: 3580 - 3583.
- 178- Orłowski, M., (1979), Biochem. J. 182: 547 - 554.
- 179- Thevelein, J. (1988), Exp. Mycol. 12: 1 - 12.
- 180- Van Mulders, A.R. y Van Laere, A.J., (1984), J. Gen. Microbiol. 130: 541 - 547.
- 181- Van Laere, A.J., (1986), FEMS Microbiol. Reviews 32: 189 - 198.
- 182- Alhanaty, E. y Shaltiel, S. (1979), Biochem. Biophys. Res. Commun. 89: 323 - 332.
- 183- Hemming, B.A., (1986), FEBS Lett. 296: 126 - 130.
- 184- Schwoch, G., (1987), Biochem. J. 248: 243 - 250.
- 185- Builder, S.E.; Beavo, J.K. y Krebs, E.G. (1980), Cold Spring Harbor Symposia on Cell Proliferation 83:33 - 44.
- 185'- Yang, S.; Fletcher, W. y Johnson, D. (1995), Biochemistry 34: 6267 - 6271.
- 186- Potter, R.L. y Taylor, S.S. (1979), 154: 2413 - 1418.

- 187- Weber, W. y Hiltz, H., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90: 1073 - 1081.
- 188- Weldon, S.L. y Taylor, S.S., (1985), *J. Biol. Chem.* 260: 4203 - 4209.
- 189- Takio, K.; Smith, S.B.; Walsh, K.A. Krebs, E.G. y Titani, K., (1983), *J. Biol. Chem.* 258: 5531 - 5536.
- 190- Mumby, M.C.; Weldon, S.L.; Scott, C.W. y Taylor, S.S., (1985), *Pharmacol. Ther.* 28: 367 - 387.
- 191- Weldon, S.L.; Mumby, M.C.; Beavo, J.A. y Taylor, S.S., (1983), *J. Biol. Chem.* 258: 1129 - 1135.
- 192- Corbin, J.D.; Sugden, P.H.; West, L.; Flockhart, D.A., Lincoln, T.M. y McCarthy, D., (1978), *J. Biol. Chem.* 253: 3997 - 4003.
- 193- Rannels, S.; Cobb, C.; Landi, S.L. y Corbin, J.D., (1985), *J. Biol. Chem.* 260: 3423 - 3430.
- 194- Herberg, F.; Dostmann, W.; Zorn, M.; Davis, S. y Taylor, S. (1994), *Biochemistry* 33: 7485 - 7494.
- 195- Buechler, Y.J.; Herberg, F.W. y Taylor, S.S., (1993), *J. Biol. Chem.* 268: 16495 - 16503.
- 195'- Muller, U y Spatz, H. (1989) *J. Neurogenet.* 6: 95 - 114.
- 195"- Pintér, M. y Friedrich, P. (1988) *Biochem. J.* 253: 467 - 473.
- 196- Juliani, M.H.; Brochetto, M.R. y Maia, J.C.C, (1979), *Cell. Differ.* 8: 421 - 430.
- 197- Marques del Valle, M.; Juliani, M.H.; Costa Maia, J.C. y Gomes, S., (1989), *Eur. J. Biochem.* 178: 803 - 810.

- 198- Marques del Valle, M.; Cantisani Borges, A.C.; Franco de Olivera, J. C. y Lopes Gomes, S., (1992), *Develop. Biol.* 149: 432 - 439.
- 199- Part, D.; de Gunzburg, J. y Veron, M., (1985), *Cell. Differ.* 17: 221:227.
- 200- Mann, S.K.O. y Firtel, R.A., (1993), *Development* 119: 135 - 146.
- 201- Brostrom, C.O.; Corbin, J.D.; King, C.A. y Krebs, E.G., (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2444 - 2447.
- 202- Ahmad, Z., Camici, M., DePaoli-Roach, A.A., Roach, P.J. (1984), *J. Biol. Chem.* 259: 3420-
- 203- Erlichman, J.; Rangel-Aldao, R. y Rosen, O., (1983), *Meth. Enzymol.* 99: 176 - 186.
- 204- Erlichman, J.; Sarker, D.; Fleischer, N. y Rubin, C., (1986), *J. Biol. Chem.* 255, 8179 - 8184.
- 205- Granot, J.; Mildvan, A.S.; Hiyama, K. Kando, H. y Kaiser, E.T, (1980), *J. Biol. Chem.* 225: 4569 - 4573.
- 206- Durgerian, S. y Taylor, S.S., (1989), *J. Biol. Chem.* 264: 9867 - 9873.
- 207- Lodi, W.R. y Sonneborn, D.R., (1974), *J. Bacteriol.* 177: 1035 - 1042.
- 208- Correa, J.U.; Lemos, E.M. y Lodi, W.R., (1978), *Dev. Biol.* 66: 470 - 479.
- 209- Brochetto-Braga, M.R.; Gomes, S.L. y Maia., J.C.C., (1982), *Arch. Biochem. Biophys.* 217: 295 - 304.
- 210- Gomes, S.L.; Juliani, M.H.; Maia, J.C.C. y Rangel-Aldao, R., (1983), *J. Biol. Chem.* 258: 6972 - 6978.
- 211- Steimberg, R.A. y Agard, A., (1981), *J. Biol. Chem.* 256: 10731- 10734.
- 212- Seigelchifer, M. y Passeron, S., (1984), *Arch. Biochem. Biophys.* 229: 403-
- 213- Seigelchifer, M. y Passeron, S., (1985), *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 12252 -

Silvia M. Muro

August 7

