

## Tesis de Posgrado

# Estudio bioquímico y estructural de la quinasa de proteínas CK2 del hongo *Candida Albicans* y su participación en la fosforilación del proteasoma 20S homólogo : Clonado de la subunidad regulatoria (beta) de la enzima

Walz, Katherina

1998

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Walz, Katherina. (1998). Estudio bioquímico y estructural de la quinasa de proteínas CK2 del hongo *Candida Albicans* y su participación en la fosforilación del proteasoma 20S homólogo : Clonado de la subunidad regulatoria (beta) de la enzima. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3014\\_Walz.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3014_Walz.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Walz, Katherina. "Estudio bioquímico y estructural de la quinasa de proteínas CK2 del hongo *Candida Albicans* y su participación en la fosforilación del proteasoma 20S homólogo : Clonado de la subunidad regulatoria (beta) de la enzima". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3014\\_Walz.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3014_Walz.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Estudio bioquímico y estructural de la quinasa de proteínas  
CK2 del hongo *Candida albicans* y su participación en la  
fosforilación del proteasoma 20S homólogo.  
Clonado de la subunidad regulatoria ( $\beta$ ) de la enzima**

Autora:  
**Katherina Walz**

Directora:  
**Dra. María Susana Di Bernardo de Passeron**

Tesis presentada para optar al título de:  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, Mayo 1998

Nº 3 0 1 4 4

ij 2

*A mis padres*

## ***AGRADECIMIENTOS***

A la Dra. Susana Passeron por haberme permitido realizar este trabajo de tesis en su laboratorio, por el apoyo recibido, por ser un ejemplo de responsabilidad y honestidad. Por haberme enseñado el abc de la ciencia, y a trabajar con el máximo rigor científico.

A la Dra. Patricia Pardo, sin quien esta tesis no sería igual, por su sabiduría, por enseñarme todo sobre la CK2, por las eternas columnas compartidas, por la ayuda impagable y por la amistad que me brindó ! Gracias Patri !

A la Dra. María Leonor Cantore, por los consejos, por la buena predisposición a la discusión, y por los momentos agradables pasados en su compañía.

A mis compañeros de laboratorio, Pedro Fernández Murray, Patricia Pardo, Pepe Biondi, Alicia Zelada, Rocío Castilla, a todos por ser tan “gauchos”, por los buenos momentos compartidos, por las charlas y las risas, por hacer tan amena mi estadía en el laboratorio. A Noemí Arguello, por su bondad, su calidez, y por todo. Los voy a extrañar !

A todos los integrantes de la Cátedra de Microbiología, por la “buena onda” y por compartir los años de trabajo de esta tesis. A Graciela y Teresa, por estar siempre dispuestas a dar una mano, y por los mate cocido de todas las mañanas.

A Juan Young, por la paciencia de explicarme todo, por la eterna buena predisposición para ayudarme cuando lo necesité. Gracias amor!

A Silvia Rossi, que contribuyó a “iluminarme” con una técnica alternativa de clonado.

A mis padres, quienes estuvieron siempre a mi lado, aguantando los buenos y los malos momentos, y que me dieron la oportunidad de llegar hasta acá. A mis hermanas, Erica y Romi, quienes son, más que hermanas, mis mejores amigas, gracias por todo !

A Juan por ser el compañero ideal, por estar siempre; y a Agustina por ser la alegría de mi vida.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las becas me otorgó y los subsidios al laboratorio que hicieron posible la realización de este trabajo.

A la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, por ser el lugar donde se realizó este trabajo y por la ayuda económica recibida por el laboratorio.

## RESUMEN

Se investigó la Ae de la CK2 a lo largo del crecimiento del hongo *Candida albicans*, observándose que esta era máxima al comienzo de la fase logarítmica de crecimiento. La CK2 de células levaduriformes del hongo se purificó a aparente homogeneidad mediante un procedimiento que incluyó 4 cromatografías. La enzima mostró las características propias de las CK2 conocidas hasta el momento. En su forma nativa, presenta un PM aparente de 159 kDa. Esta compuesta por 4 polipéptidos diferentes; los polipéptidos de 39 y 37 kDa se identificaron como las subunidades catalíticas por experimentos de fosforilación *in situ* e inmunoreconocimiento. Los de 44 y 36 kDa fueron identificados como 2 subunidades regulatorias diferentes por autofosforilación e inmunoreconocimiento.

Se estudió la fosforilación del proteasoma 20S de *C. albicans* por la CK2 homóloga, siendo esta totalmente dependiente de polilisina. Se identificó la subunidad mayoritariamente fosforilada como el componente  $\alpha 7/C8$ , por inmunoreconocimiento y secuenciación de un fragmento tríptico. Los resultados de este trabajo indican la existencia de más de un sitio de fosforilación en esta subunidad.

Se logró el clonado del gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la CK2, obteniéndose un PM teórico para la proteína deducida de 33,7 kDa y un punto isoelectrónico de 4,53. En la secuencia se encuentran presentes además de mayoría de los aminoácidos conservados en el resto de las subunidades regulatorias conocidas hasta el momento una inserción de 25 aminoácidos en la región central y una extensión hacia el extremo C-terminal.

Palabras claves: *Candida albicans*, CK2, subunidad  $\beta$ , proteasoma 20S

## INTRODUCCION

1. Fosforilación de proteínas	1
2. Proteína quinasa CK2	3
2.1 Breve reseña histórica	3
2.2 Generalidades	5
2.3 Especificidad de sustratos de la CK2	6
2.4 Moduladores <i>in vitro</i> de la actividad de CK2	11
2.4.1 Estados agregados de la enzima	11
2.5 Estructura molecular de la CK2	12
2.5.1 Subunidad catalítica ( $\alpha$ ), estructura y función	12
2.5.2 Subunidad regulatoria ( $\beta$ ), aspectos estructurales y funcionales	15
2.5.3 Interacción de las subunidades	18
2.6 Interacción con diferentes proteínas	19
2.7 Roles fisiológicos de la CK2	21
3. Identificación de sustratos	22
3.1 Proteasoma 20S	22
4. Organismo	23
4.1 Introducción a <i>C. albicans</i>	23

OBJETIVOS	29
-----------	----

## MATERIALES Y METODOS

1. Crecimiento y mantenimiento de <i>C. albicans</i>	30
1.1 Mantenimiento de la cepa	30
1.2 Medio de Soll y Bedell	30
1.3 Crecimiento de <i>C. albicans</i>	30
1.4 Inducción de la germinación	30
2. Preparación de extractos de <i>C. albicans</i>	31
2.1 Extractos solubles para purificación de la CK2	31
2.2 Extractos solubles para medición de la actividad CK2	31
2.3 Inhibidores de proteasas	32
3. Medición de la actividad enzimática de la CK2	32
4. Purificación de la CK2 de <i>C. albicans</i>	33
4.1 DE-52	33
4.2 Fosfo-celulosa	33
4.3 Q-Sepharosa	34
4.4 Heparina-agarosa	34
5. Determinación de la concentración de proteínas	34
6. Estimación de los parámetros estructurales e hidrodinámicos	35
6.1 Coeficiente de sedimentación. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa	35
6.2 Radio de Stokes. Tamíz molecular	35
6.3 Estimación del peso molecular de la CK2	36

6.4 Coeficiente friccional	36
7. Electroforesis en geles de poliacrilamida	37
8. Ensayos de autofosforilación	37
9. Detección de las subunidades catalíticas de la CK2 <i>in situ</i> (geles activos)	38
10. Técnica de western blot	38
11. Determinación del aminoácido fosforilado	40
12. Fosforilación del proteasoma 20S por CK2	41
13. Cultivo de la cepa de <i>E. coli</i>	41
13.1 Medio LB	41
14. Aislamiento de ADN	42
14.1 ADN genómico de <i>C. albicans</i>	42
14.2 Minipreparación de ADN plasmídico	42
14.3 Precipitación con fenol:cloroformo	43
15. Amplificación por PCR	43
15.1 Diseño de los primers	43
15.2 Reacción de PCR	46
15.3 Marcación del fragmento por amplificación por PCR	47
16. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	47
17. Clonado de los fragmentos amplificados por PCR	48

## RESULTADOS Y DISCUSION

1. Medición de la actividad de la CK2 durante el crecimiento y la morfogénesis de <i>C. albicans</i>	49
1.1 Medición de la actividad de CK2 en extractos de <i>C. albicans</i>	49
1.2 Medición de la actividad de la CK2 durante el crecimiento levaduriforme y la morfogénesis de <i>C. albicans</i>	50
1.3 Integración	52
2. Purificación y caracterización de la CK2 de <i>C. albicans</i>	53
2.1 Purificación de la CK2 de <i>C. albicans</i>	53
2.2 Caracterización de la enzima	55
2.2.1 Parámetros estructurales	55
2.2.1.1 Determinación del coeficiente de sedimentación	56
2.2.1.2 Determinación del radio de Stokes	56
2.2.1.3 Determinación del peso molecular de la CK2 nativa	56
2.2.1.4 Determinación del coeficiente friccional	58
2.2.1.5 Identificación de las subunidades de la CK2 de <i>C. albicans</i>	58
2.2.1.5.1 Identificación de las subunidades catalíticas	59
2.2.1.5.1.1 Fosforilación <i>in situ</i> , geles activos	59
2.2.1.5.1.2 Western blot	60
2.2.1.5.2 Identificación de las subunidades regulatorias	62
2.2.1.5.2.1 Ensayos de autofosforilación	62
2.2.1.5.2.2 Western blot	62
2.2.2 Características bioquímicas	63
2.2.2.1 Dadores de fosfato	63

2.2.2.2 Sustratos proteicos y peptídicos	63
2.2.2.3 Efecto del ClNa, compuestos policatiónicos y heparina sobre la actividad CK2	65
2.3 Inactivación térmica de la CK2	68
2.4 Gradientes de sacarosa	69
2.5 Integración	70
3. Fosforilación del proteasoma 20S de <i>C. albicans</i>	72
3.1 Fosforilación del proteasoma 20S por la subunidad $\alpha$ recombinante humana de la CK2	74
3.2 Identificación de la banda mayoritariamente fosforilada del proteasoma 20S	76
3.3 Integración	79
4. Clonado de las subunidades $\beta$ de la CK2 de <i>C. albicans</i>	80
4.1 Amplificación de un fragmento a partir de primers degenerados	81
4.2 Integración	92
<i>DISCUSION GENERAL</i>	94
<i>PERSPECTIVAS</i>	96
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	97

## ***INTRODUCCION***

## **INTRODUCCION**

### **1. Fosforilación de proteínas**

La existencia de quinasas de proteínas, enzimas que catalizan la fosforilación de proteínas, estaba de alguna manera implícita en el descubrimiento que tanto la caseína (Hammarsten, 1883) como la fosvitina (Levene y Alsberg, 1900) eran compuestos proteicos que contenían fosfatos.

En la década del 50, a partir del descubrimiento de la fosforilasa quinasa por el grupo de Fisher y Krebs (1956), la fosforilación de proteínas se reveló como un sensible mecanismo regulatorio de la actividad enzimática, debido a sus características de modificación covalente y reversible.

En 1978 el descubrimiento que la proteína transformante del sarcoma de Rous, pp60v-scr, tenía actividad de quinasa de proteínas (Collet y Erickson, 1978) y que transfería fosfato a residuos de tirosina abrió una nueva dimensión en el campo de la fosforilación de proteínas.

A fines de la década del 70 sólo unas pocas quinasas de proteínas habían sido caracterizadas, sin embargo a partir de la década del 80 el número de miembros de la familia de las quinasas de proteínas ha ido aumentando en forma exponencial y actualmente se han identificado, sólo en mamíferos, más de 100 quinasas diferentes. Este crecimiento acelerado en el descubrimiento de nuevas quinasas se ha dado fundamentalmente a partir del clonado molecular y de las técnicas de secuenciación.

Las quinasas de proteínas conforman una familia diversa que comprende desde receptores de factores de crecimiento que atraviesan la membrana hasta quinasas de proteínas que controlan el ciclo celular.

Las quinasas pueden ser clasificadas, según el tipo de aminoácido que fosforilan, en dos grupos generales: aquellas que transfieren un grupo fosfato a los aminoácidos serina o treonina (Ser/Thr quinasas) y aquellas que los transfieren al aminoácido tirosina (Tyr quinasas).

Dentro del primer grupo se incluyen la quinasa de proteínas dependiente de AMP cíclico (PKA), la quinasa dependiente de GMP cíclico (PKG), la quinasa de proteínas C (PKC), la quinasa dependiente de  $Ca^{2+}$ -calmodulina (CaMK), la quinasa de proteínas CK1 (CK1), la quinasa de proteínas CK2 (CK2), las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), la quinasa Raf, la quinasa de proteínas activada por mitógenos (MAPK), y la quinasa de proteínas dependiente de DNA (DNA-PK).

Entre las quinasas que fosforilan residuos de tirosina está la subfamilia de tirosinas quinasas Src que en su mayoría se encuentran asociadas a la membrana intracelular, los receptores tirosina quinasa como el receptor de insulina, los receptores de factores de crecimiento como EGF y PDGF y las tirosinas quinasas citoplasmáticas como la quinasa Abl Tipo I.

La quinasa de la quinasa MAPK (MAPKK) sería una quinasa perteneciente a ambos grupos ya que fosforila residuos de treonina y tirosina.

Existe un tercer grupo de quinasas, las histidina/aspártico quinasas que son quinasas de proteínas descubiertas en bacterias las cuales se autofosforilan en residuos de histidina y transfieren este fosfato a un residuo de ácido aspártico. En eucariotas superiores se han encontrado secuencias homólogas a estas quinasas procarióticas pero sólo se ha detectado actividad de quinasa histidina/aspártico en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Swanson y col. 1994).

Con excepción de las quinasas oncogénicas, todas las quinasas de proteínas son enzimas fuertemente reguladas y son activadas o desactivadas en respuesta a señales específicas tan diversas como los nucleótidos AMPc, GMPc y AMP (PKA, PKG, y quinasa dependiente de AMP respectivamente),  $Ca^{2+}$  (CaMK), diacilglicerol (PKC), RNA de doble cadena y hemina (IF-2 quinasas), ciclinas (CDKs) y fosforilación (MAPK, MAPKK, Raf).

Los estudios comparativos de las secuencias de los miembros de la familia de las quinasas han demostrado que estas enzimas, a pesar de su considerable diversidad, han evolucionado al menos en parte de un ancestro común. Las regiones de estas proteínas que no están involucradas en la función catalítica y que no guardan entre si relaciones evolutivas evidentes, serían las responsables de la localización subcelular así como de la regulación y activación de cada una de ellas.

## **2. Proteína quinasa CK2**

### **2.1 Breve reseña histórica**

Hace 40 años Burnett y Kennedy (1954), utilizando caseína como fosfoaceptor y ATP como dador, detectaron en extractos de hígado de rata una actividad enzimática capaz de catalizar la transferencia de un grupo fosfato a la proteína aceptora. Esta actividad estaba dada por la mezcla de dos enzimas que luego fueron llamadas caseína quinasa 1 y caseína quinasa 2, siendo la nomenclatura actual quinasa de proteínas CK1 y CK2 respectivamente.

En 1960 Rabinowitz y Lipmann demostraron que la actividad capaz de fosforilar caseína se encontraba presente también en cerebro de rata y en levaduras; esta actividad era igualmente eficiente en la fosforilación de fosvitina pero era incapaz de fosforilar a la fosforilasa-b; diferenciándose así de la actividad fosforilasa quinasa, la proteína quinasa identificada por Krebs y Fischer (1956) como la enzima responsable del pasaje de la fosforilasa-b a fosforilasa-a.

Al final de los años 60 se hizo claro que la capacidad de utilizar GTP, además de ATP, como dador de fosfato (Rodnight y Lavin, 1964) era exclusiva de la CK2, diferenciándose así de la CK1.

En 1977, la obtención de una fracción altamente purificada de CK2 por Thornburg y Lindell llevó al conocimiento de su estructura heterotetramérica, permitió identificar a la heparina como uno de los inhibidores más potentes de esta enzima (Hathaway y col., 1980) e hizo posible la comprensión de su inusual especificidad hacia los sustratos, determinada por residuos ácidos (Meggio y col., 1978) en contraste con la mayoría de las Ser/Thr quinasas que reconocen determinantes básicos (ver con más detalle en especificidad de sustratos de la CK2).

Cabe destacar que, salvo algunos pocos informes, al final de los años 70 sólo se sabía que la CK2 era una enzima detectada *in vitro* con sustratos no fisiológicos cuyos sustratos endógenos, modos de acción y rol biológico eran totalmente desconocidos.

En 1976 se encontró que el factor de iniciación de la traducción de proteínas eIF-3 era fosforilado *in vitro* por la CK2 (Traugh y col., 1976; Issinger y col., 1976). Este fue el primer sustrato fisiológico descubierto de la CK2 y por algunos años fue el único, sugiriendo que la CK2 tendría un rol específico en la regulación de la síntesis de proteínas.

Cuatro años mas tarde, sin embargo, se demostró que la proteína <sup>1</sup>HMG 17 también era sustrato de la CK2 (Inoue y col., 1980), seguido por la ARN polimerasa I y II (Dahmus 1981), la glucógeno sintetasa (De Paoli-Roach y col., 1981; Meggio y col., 1981); la troponina-T (Villar-Palasi y Kumon, 1981; Pinna y col., 1981) y la calsequestrina (Meggio y col., 1981). Esto dio origen a un efecto “bola de nieve” en la detección de nuevos sustratos, sugiriendo que el rol fisiológico de la CK2 no se restringiría a una sola función celular sino que más bien tendría un efecto pleiotrópico.

1

Muchos de los sustratos de la CK2 lo son también de otras quinasas y en algunos casos estas múltiples fosforilaciones son interdependientes y sus efectos son sinérgicos

---

<sup>1</sup> 1 HMG 17 Del inglés “high mobility group protein” proteína de gran movilidad, cuya masa molecular aparente es de 17 kDa.

(Roach, 1991). Este hallazgo muestra la existencia de relaciones funcionales entre la CK2 y otras quinasas.

El conocimiento de la estructura primaria de las subunidades catalíticas de la enzima (Saxena y col., 1987; Takio y col. 1987; Lozeman y col., 1990) mediante técnicas de biología molecular, reveló la existencia de secuencias consenso presentes en las demás quinasas de proteínas.

## **2.2 Generalidades**

La CK2 es una Ser/Thr quinasa altamente conservada y ubicuamente distribuida en los organismos eucariotas, de localización citoplasmática y nuclear (Pinna, 1990; Tuazon y Traugh, 1991).

Se han identificado más de 100 sustratos de esta quinasa, entre los cuales se encuentran factores de transcripción, factores de traducción, proteínas que intervienen en la transducción de señales y en la arquitectura del citoesqueleto, indicando que esta quinasa estaría involucrada en numerosas funciones celulares.

Una característica de esta enzima que la distingue de la mayoría de la otras quinasas es la capacidad de utilizar GTP y ATP como dadores de fosfato ( $K_m$  aparentes: 20  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  respectivamente).

La CK2 es constitutivamente activa y su actividad no se ve afectada por ninguno de los segundos mensajeros clásicos tales como nucleótidos cíclicos, diacilglicerol o calcio. *In vitro*, su capacidad catalítica se ve estimulada por policationes e inhibida por polianiones (Pinna, 1990).

La holoenzima aislada de diferentes fuentes es un heterotetrámero de un peso molecular aproximado de 130 kDa, constituido por dos subunidades catalíticas ( $\alpha$ ) y dos

regulatorias ( $\beta$ ) con una estructura general  $\alpha_2\beta_2$ , donde las subunidades se encuentran fuertemente unidas y no se separan salvo en condiciones desnaturalizantes.

La fosforilación de proteínas parece no ser la única función de la CK2. Sorprendentemente Mitchell y col. (1994) describieron que la CK2 nucleotidila *in vitro* a una proteína codificada por el gen  $\alpha$  22 del virus Herpes simplex 1. No se sabe aún si la CK2 presenta esta actividad nucleotidilante con otro sustrato.

### **2.3 Especificidad de sustratos de la CK2**

La capacidad de la enzima para reconocer residuos de serina o treonina sumergidos en un entorno ácido se evidenció por estudios con sustratos no fisiológicos como la caseína (Pinna y col., 1979; Tuazon y col., 1979) y el inhibidor de tripsina de soja (Meggio y col., 1979). Más tarde con el conocimiento de los sustratos naturales de la CK2 (**tabla I-I**) se hizo evidente que la misma reconoce residuos de serina y menos frecuentemente residuos de treonina. Una lista de los sustratos encontrados hasta el año 1990 se resume en la tabla I-I (para una revisión ver Pinna, 1990). La aparición de nuevos sustratos de la CK2 continúa en forma vertiginosa, debiendo agregarse a los sustratos que se mencionan en la tabla I-I la nucleósido difosfato quinasa (NDPK) (Engel y col., 1994); subunidades del tipo  $\alpha$  del complejo multicatalítico proteosoma 20S (Ludemann y col., 1993; Castaño y col., 1996); la proteína supresora de tumores p53 (Filhol y col., 1992); la ADN topoisomerasa II (Kimura y col., 1996) y el producto oncogénico del gen mdm2 (Guerra y col., 1997); entre otros.

El análisis de las secuencias que rodean al sitio de fosforilación de la CK2 de los sustratos conocidos hasta el momento y el uso de péptidos sintéticos como modelos proveyó una gran información sobre los determinantes de la especificidad de esta enzima. La secuencia consenso mínima para la fosforilación por CK2 es: S/T-X-X-E/D (Marchiori y col., 1988), siendo de vital importancia la presencia de un residuo ácido en la posición + 3 (Marin y col., 1986). Sin embargo se necesitan determinantes positivos adicionales para lograr una fosforilación eficiente tales como múltiples residuos ácidos rodeando la Ser/Thr





52	p 53 ratón (ser 389)	K K V G P D S D
53	pp35 proliferation PP	P Q L S Y L D G Y D D E
54	β-tubulina (scr 444)	Y E D D E E E S E S Q G P K
55	Mannosa-6-P rec. (ser 2421)	D E Q D S E D E V L
56	Mannosa-6-P rec. (ser 2492)	F H D D S D E D L L H
57	HPV E7 (ser 31)	E Q L N D S S E E E D E I D
58	HPV E7 (ser 32)	E Q L N D S S E E E D E I D
59	Serum Resp. Factor (ser 83)	Y S G S E G D S E S G E E E E L
60	Serum Resp. Factor (ser 85)	S G S E G D S E S G E E E E L
61	Neuromodulina (ser 192)	P T E T A E S S Q A E E E K D A
62	Neuromodulina (ser 193)	P T E T A E S S Q A E E E K D A
63	PKC (ser 11)	A A G P P P S E G E E S T
64	Caldesmon (ser 73)	S E V N A Q N S V A E D E T K
65	Calsequestrina card. (ser 378)	D D G N N S D E E S N D D S D
66	Calsequestrina card. (ser 382)	D G N N S D E E S N D D S D D D D E
67	Calsequestrina card. (ser 386)	S D E E S N D D S D D D D E
68	Calsequestrina skel. (treo 363)	L E G E I N T E D D D D D E
69	DSIP péptido (ser 7)	W A G G D A S G E
70	Topoisomerasa I (ser 10)	L H N D S Q I E A D F R
71	RAB-17 (ser 76-84, 4 sitios)	S G S S S S S S S E E D G M G
72	P0, P1, P2 sitios C- term.	E E S E E S D D D M G F
73	P0, P1, P2 sitios C- term.	E E S E E S D D D M G F
74	neurobl. MYCN (ser 367)	N S D S E D S E R
75	p34 cdc2 (ser 39)	K I R L E S E E E G V P S T
76	c-jun (treo 231)	K E E P Q T V P E M P G E T P
77	c-jun (ser 243)	T P P L S P I D M E S Q
78	Va S. Virus PP (ser 59)	E E E A S D S D A D
79	Va S. Virus PP (ser 61)	E E E A S D S D A D
80	Nef	M D D V D S D D D D
81	Adenovirus E1a	H E A G F P P S D D E D E E G
82	CK2 β	M S S S E E V S W
83	Ag. 2 Nuclear Epstein-Barr (ser 469)	F E T T E S P S S D E D Y
84	Ag. 2 Nuclear Epstein-Barr	F E T T E S P S S D E D Y
85	Proteína Max (ser 2)	M S D D D I E V E S D
86	Proteína Max (ser 11)	S D D D I R V E S D E E
87	Proteína del VSV (ser 59)	E E E S S D S D T D Y
88	Proteína del VSV (ser 61)	E E E S S D S D T D Y
89	N-myc ratón (ser 261)	S G E D T L S D S D D E D D E E
90	N-myc ratón (ser 263)	S G E D T L S D S D D E D D E E E D
91	Proteína ZEBRA (ser 167)	Q Q P E S L E E C D S E L E
92	Proteína ZEBRA (ser 167)	P E S L E E C D S E L E I
93	Proteína CREM (treo 94)	A E T D D S A D S E
94	Proteína CREM (scr 140)	E E E K S E E
95	Calnexina (ser 535)	Q K S D A E E D G G
96	Calnexina (ser 545)	E D G G T A S Q E E D D
97	Calnexina (treo 74)	A K K D D T D D E I A K
98	Recept. Vit. D (ser 208)	L D L S E E D S D D
99	Sinaptotagmina (treo 128)	D D D A E T G L S D G E E K E E P
100	IGFBP- 1 (ser 101)	P E S P E S T E I T E E E L L
101	IGFBP- 1 (ser 169)	A Q E T S G E E I S K F
102	IGFBP- 1 (ser 191)	M A P S E E D H S I L
103	Fact. transcrip. PU-1 (ser 148)	S P P L E V S D G E A D G L E
104	Recep. insulina Sub.-1 (treo 502)	G T S P A L T G D E A A G A A

105	Recep. insulina Sub.-1 (ser 99)	A I A A D S E A E Q D S
106	Proteína VZV (treo 596)	F E D S E S T D T E E E K
107	Proteína VZV (treo 598)	F E D S E S T D T E E E K

La gran mayoría de los sustratos cumplen con esta secuencia consenso. Existen, sin embargo, proteínas que son capaces de ser fosforiladas por la CK2 pero presentan diferencias en las secuencias adyacentes al sitio de fosforilación.

En estos casos es posible que se logre una fosforilación eficiente debido a que la estructura terciaria de la proteína en cuestión puede de alguna manera “sobreponerse” a la falta de determinantes estructurales locales positivos. Esta hipótesis se ve fuertemente apoyada en el hecho que las constantes cinéticas de fosforilación por CK2 de péptidos que reproducen los sitios de fosforilación de esta quinasa no siempre son comparables con las de la proteína nativa en cuestión, siendo, por el contrario, en la mayoría de los casos peores sustratos (Meggio y col., 1994-b). Esto se aplica, por ejemplo, a la subunidad  $\beta$  de la misma CK2 cuya fosforilación requiere la presencia de una secuencia rica en aminoácidos ácidos que se encuentra aproximadamente a 50 residuos hacia el extremo C terminal del sitio fosfoceptor pero que probablemente se encuentre cerca de éste por el plegado de la proteína (Boldyreff y col., 1994).

Otro ejemplo es el de la proteína supresora de tumores p53, que tiene el sitio de fosforilación situado en el extremo C terminal y que no presenta la secuencia consenso para la fosforilación por CK2. Consecuentemente, el péptido que reproduce este sitio de fosforilación es un sustrato muy pobre. La proteína intacta, sin embargo, es un sustrato excelente (Meggio y col., 1994b).

Por otro lado, el efecto opuesto también se ha observado. Un sitio que no es afectado por la CK2 en la proteína completa (ej.: la ser 174 del inhibidor-2) es fosforilado cuando se lo reproduce en un péptido sintético (Marin y col., 1994 a-b).

Por lo tanto, la especificidad de sustratos de la CK2 parece ser el resultado de una variedad de factores estructurales tanto locales como dependientes de la estructura terciaria de la proteína sustrato.

Muy recientemente, Wilson y col. (1997), informaron la fosforilación por la CK2 de la inmunofilina nucleolar Fpr3 de *S. cerevisiae* en un residuo de tirosina en la posición 184, además de una serina vecina, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados indicarían que la CK2 poseería una especificidad dual.

#### **2.4 Moduladores *in vitro* de la actividad de CK2**

Compuestos polibásicos como las poliaminas naturales espermina y espermidina y polipéptidos polibásicos como la polilisina estimulan la actividad basal de la enzima de dos a tres veces. El grado de estimulación en todos los casos depende de la naturaleza del sustrato utilizado.

El ClNa es otro activador clásico de la enzima siendo en general la concentración óptima alrededor de 100 mM.

Por otro lado, compuestos polianiónicos inhiben la actividad de la CK2, siendo la heparina el inhibidor mas potente (IC<sub>50</sub> 1,4 nM aproximadamente). Otros compuestos ácidos como el 2,3-difosfoglicerato o los derivados benzimidazólicos (Pinna, 1990) también tienen actividad inhibitoria. La actividad catalítica se ve inhibida también por el ADN, tanto la doble cadena como la simple afectan la actividad de la CK2 de manera independiente de la secuencia nucleotídica (Gatica y col., 1995). Por otro lado, un inhibidor específico de la transcripción, el 5,6-dicloro-1-β-D-ribofuranosilbenzimidazol, es también un inhibidor selectivo de la CK2 (Meggio y col. 1990).

##### **2.4.1 Estados agregados de la enzima.**

Una propiedad bien conocida de la CK2 es su tendencia a autoagregarse en condiciones de baja fuerza iónica, este es un proceso ordenado y reversible que da como productos polímeros filamentosos de la enzima (Glover, 1986). En los últimos años Valero y col., (1995) aportaron evidencias de una estrecha relación entre el estado de agregación de la enzima y su actividad catalítica. Según estos autores, a bajas concentraciones iónicas,

tanto el agregado de poliaminas como la presencia de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  promueven la desagregación de la enzima y la estabilización de una estructura del tipo anillo, formada por cuatro moléculas de CK2 que representaría la forma más activa de la enzima. Aún no se ha demostrado la existencia de las formas poliméricas de la enzima *in vivo*.

## **2.5 Estructura molecular de la CK2**

La holoenzima aislada de varios organismos es un heterotetrámero con un peso molecular aparente de 130 kDa. El tetrámero está compuesto por dos subunidades catalíticas ( $\alpha$ ) y dos regulatorias ( $\beta$ ), con una estructura general  $\alpha_2\beta_2$ . Tanto la estructura heterotetramérica como el rango de las masas moleculares de las mismas están altamente conservadas en la mayoría de los organismos.

En 1983 Cochet y Chambaz informaron por primera vez la separación de las subunidades de la CK2 mediante la técnica de SDS-PAGE y luego de la renaturalización de las mismas, pudieron adscribir a la subunidad  $\alpha$  la capacidad catalítica y a la subunidad  $\beta$  los aspectos regulatorios de dicha actividad. El estudio de las subunidades se vió acelerado con el advenimiento de las técnicas de biología molecular y la disponibilidad de las subunidades expresadas.

### **2.5.1 Subunidad catalítica ( $\alpha$ ), estructura y función**

Se han descrito en la mayoría de los organismos dos subunidades diferentes ( $\alpha$  y  $\alpha'$ ) de pesos moleculares que van desde 36 a 44 kDa, codificadas por genes diferentes. Sin embargo sólo una subunidad catalítica ( $\alpha$ ) se ha encontrado en *Xenopus laevis*, (Mulner-Lorillon y col., 1988), *Drosophila melanogaster*, (Glover y col., 1983), *Caenorhabditis elegans* (Hu y Rubin, 1990), y *Schizosaccharomyces pombe* (Roussou y Draetta, 1994).

Se han clonado hasta el momento los genes que codifican para la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\alpha'$  de numerosos organismos y especies desde levaduras hasta mamíferos y plantas. Para una revisión al tema ver Allende y Allende, (1995).

Las dos subunidades muestran un alto grado de conservación a nivel de la composición aminoacídica. Por ejemplo, las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  humanas presentan una similitud del 85% entre ellas, y tienen un 98% y 97% de homología con sus pares en gallina. La identidad de aminoácidos entre las subunidades  $\alpha$  humana y de maíz es de 75% y entre la humana y la de levadura es de 64%.

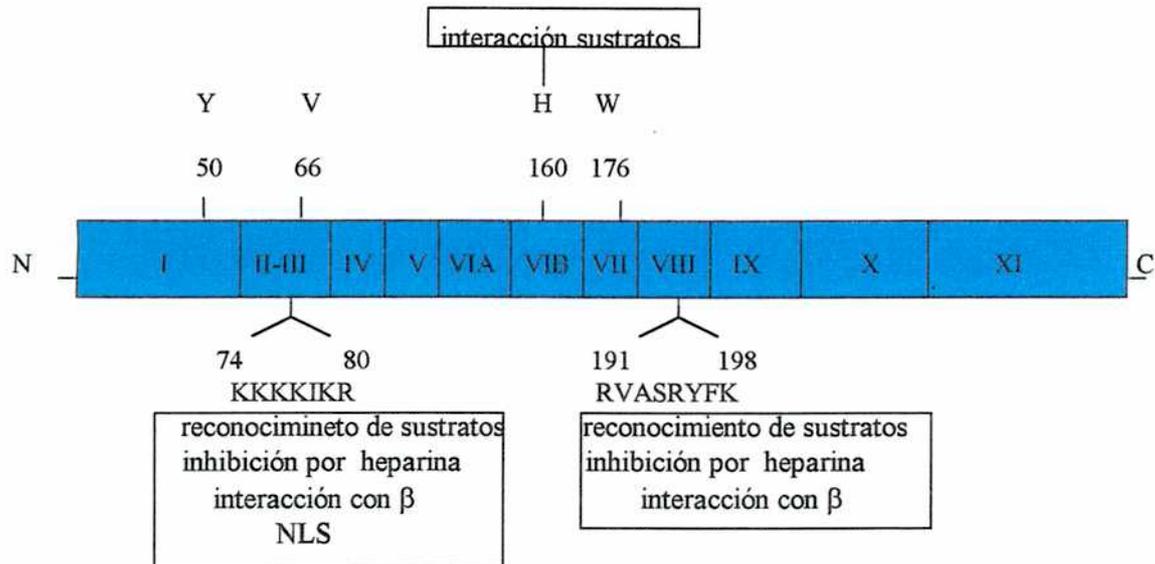
Dentro del árbol evolutivo de las proteínas quinasas, las subunidades catalíticas de la CK2 se encuentran en la rama de las quinasas dependientes de ciclinas y las quinasas activadas por factores mitógenos (MAPK), todas estas quinasas involucradas en el control del ciclo celular.

Todas las subunidades catalíticas de las proteínas quinasas descritas hasta el momento presentan 11 subdominios conservados en su secuencia aminoacídica (Hanks y Quinn, 1991). Las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  de la CK2 presentan las secuencias típicas de los subdominios catalíticos de las demás proteínas quinasas. Sin embargo, existen algunos aspectos distintivos que merecen mencionarse (ver figura I-1):

-El subdominio I contiene la región de unión típica de co-sustratos -LGXGXXSXV- en la posición 45-53. Lo notable es que dentro de esta región se encuentra una Tyr en la posición 50, que generalmente no se encuentra en otras quinasas, aunque sí está presente en el grupo de las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (cdks). Las cdks son fosforiladas y defosforiladas en esta tirosina, dando como resultado su activación o desactivación. No se sabe aún si esta fosforilación se da también en las subunidades catalíticas de la CK2.

-Entre los subdominios II y III se encuentra una región básica: KKKKIKR, a diferencia de la mayoría de las quinasas en las cuales esta secuencia es acídica. Esta región estaría involucrada en la interacción con proteínas sustrato, como la hsp 49, con la subunidad  $\beta$  y con inhibidores como la heparina .

En esta secuencia básica, así mismo, se encuentran las señales de localización en núcleo, las cuáles podrían ser responsables de la localización nuclear de la enzima (Rihis y col., 1991).



**Figura I-I** Regiones sobresalientes de la estructura primaria de la subunidad  $\alpha$  de la CK2

Sobre la estructura primaria conocida de la subunidad  $\alpha$  de la quinasa de proteínas CK2 humana se indican las regiones que están implicadas en funciones específicas. Los números romanos señalan los subdominios de la subunidad catalítica homólogos a los definidos por Hanks y Hunter, 1995. Los números arábigos indican la posición de los residuos dentro de la secuencia. NLS señal de localización nuclear.

-La CK2 presenta aminoácidos atípicos dentro de las regiones II y VII. Así la CK2 difiere del 95% de las quinasas por tener una valina en la posición 66 en lugar de una alanina (región II), y un triptofano en lugar de una fenilalanina en la posición 176 (subdominio VII). Estas dos regiones participan en la interacción de las quinasas con el ATP (Taylor y col., 1993). Las diferencias encontradas en la CK2 tienen que ver con su capacidad de utilizar tanto ATP como GTP como dadores de fosfato (Jakobi y Traugh, 1992; Jakobi y Traugh, 1995).

-en el subdominio VIB la CK2 presenta un histidina en la posición 160 que sería fundamental para el reconocimiento de las proteínas sustratos (Dobrowolska y col., 1994).

La CK2 se puede autofosforilar en la subunidad  $\alpha$ . Esta fosforilación es débil en ausencia de la subunidad  $\beta$ . En presencia de  $\beta$ , la espermina y la polilisina pueden estimular esta autofosforilación considerablemente (Boldyreff y col., 1994). El sitio de autofosforilación no se conoce pero la secuencia T125LTDYD130 contiene dos treoninas que satisfacen los requerimientos de la CK2.

Estudios bioquímicos realizados con las subunidades recombinantes  $\alpha$  y  $\alpha'$  indican que estas tienen propiedades semejantes en cuanto a la utilización de ATP o GTP, la  $K_m$  de los sustratos estudiados, la inhibición por heparina y las concentraciones óptimas de  $Mn^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ , si bien difieren un tanto en la sensibilidad al ClNa. (Antonelli y col., 1996).

### **2.5.2 Subunidad regulatoria ( $\beta$ ), aspectos estructurales y funcionales**

La subunidad  $\beta$  con un peso molecular aproximado de 25 kDa es inactiva en sí misma. Para la mayoría de los sustratos activa a la subunidad catalítica de 5 a 10 veces. Con ciertos sustratos, sin embargo, su presencia es inhibitoria, teniendo así un efecto dual sobre la actividad quinasa. Por otro lado, la presencia de la subunidad  $\beta$  estabiliza a la subunidad  $\alpha$  y le confiere mayor estabilidad térmica y resistencia a proteólisis (para una revisión ver Pinna, 1990; Allende y Allende, 1995).

En la mayoría de los organismos se ha encontrado, hasta el momento, sólo una isoforma de la subunidad  $\beta$ . La primera descripción de dos subunidades regulatorias diferentes formando parte de la holoenzima se produjo en 1994, cuando Bidwai y col. demostraron la presencia en la quinasa de proteínas CK2 de *S. cerevisiae*, de dos subunidades regulatorias diferentes con pesos moleculares de 41 y 32 kDa.

La existencia de dos genes estrechamente relacionados para las subunidades  $\beta$  en *Arabidopsis thaliana* (Collinge y Walker, 1994) indica que este fenómeno existe también en algunas especies de plantas.

Otra proteína relacionada con la subunidad  $\beta$  es el producto del gen *Stellate* que se expresa en testículos de machos estériles de *D. melanogaster*. La proteína *Stellate* es capaz de interactuar con la subunidad  $\alpha$  de la CK2 humana y formar una holoenzima activa (Livak, 1990). En conjunto, todas estas evidencias, sugieren que la existencia de diferentes subunidades  $\beta$  sería más general de lo que se pensaba inicialmente y abre nuevas posibilidades donde las diferentes subunidades  $\beta$  podrían estar relacionadas con diferentes especificidades de sustratos o la localización de la enzima en distintos compartimentos celulares.

Por otro lado en *Dictyostelium discoideum* (Renard y col., 1984) y en muchas plantas (Yan y Tao, 1982; Dobrowolska y col., 1992), no se identificó ninguna subunidad  $\beta$  aunque si la existencia de actividad catalítica de CK2.

La comparación de las secuencias de las subunidades  $\beta$  clonadas hasta el momento, muestra que existe una identidad total entre las subunidades  $\beta$  humana, de ratón, de cerdo y de gallina, un 98 % de similitud con la de *D. melanogaster* y más de un 90 % de similitud con la de *C. elegans* (excepto por la desviación debida a la secuencia C terminal), (para una revisión ver Allende y Allende, 1995).

Como se mencionó anteriormente la subunidad  $\beta$  está implicada en la regulación de la actividad quinasa de la CK2. Con la mayoría de los sustratos presenta un efecto estimulador, mientras que con unos pocos, siendo el más estudiado la calmodulina, el efecto es inhibitorio.

En un trabajo muy reciente, Marin y col, (1997), lograron identificar dentro de la secuencia de la subunidad  $\beta$  los dominios responsables de ambos efectos. El segmento que va desde el aminoácido 155 al 215 posee sólo las características positivas de la subunidad  $\beta$  estimulando a la subunidad catalítica. En amplio contraste, el péptido que lleva la secuencia desde el aminoácido 1 al 77 inhibe la fosforilación, quedando así definidos los dominios responsables de la activación o de la inhibición de la actividad CK2 por la subunidad  $\beta$ .

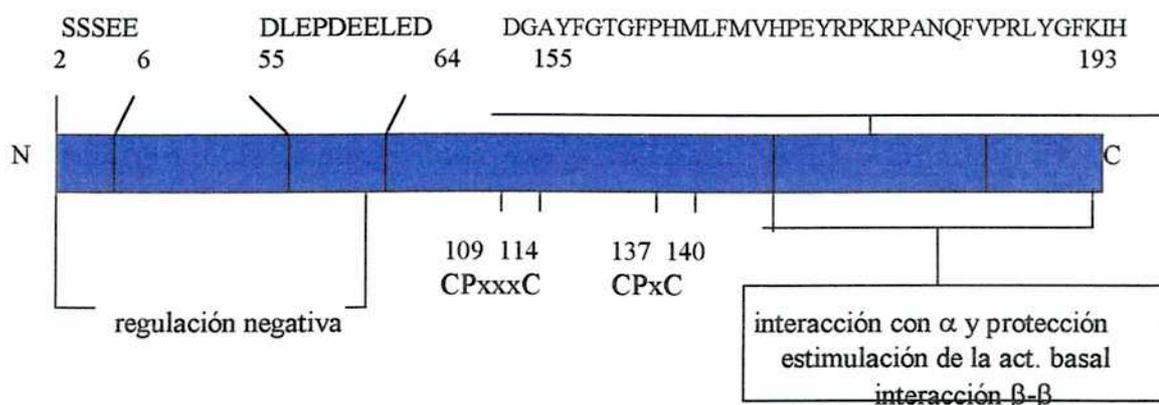
Estos hallazgos permiten explicar el efecto dual de la subunidad  $\beta$  sobre la actividad de la CK2 como el resultado de un “balance”, donde las interacciones entre el dominio activador y el dominio inhibidor de la subunidad  $\beta$  y la proteína sustrato da como resultado la fosforilación o no de la misma.

La región N terminal de la subunidad  $\beta$  de la CK2 humana (MSSSEE-, posición 1-6) tiene un sitio de autofosforilación en ambas serinas (2 y 3) (Bodenbach y col., 1994). Originariamente se supuso que esta autofosforilación estaba relacionada con la capacidad de modular la actividad de la CK2, estudios posteriores en los que se reemplazaron las serinas por alaninas demostraron que la capacidad de modular *in vitro* la actividad de las subunidades  $\alpha$  o  $\alpha'$  no se vio afectada por estos cambios (Bodenbach y col., 1994). Por otro lado, esta secuencia está presente sólo en algunas de las subunidades  $\beta$  (Bidwai y col., 1995). Es muy notable un conjunto conservado de residuos ácidos en la región N terminal (-DLEPDEELED-, posiciones 55-64). Este segmento parece ser el principal sitio de contacto entre la subunidad  $\beta$  y las subunidades catalíticas, y el responsable del control negativo que ejerce la subunidad  $\beta$  sobre la actividad quinasa de la CK2 puesto que el reemplazo de estos residuos ácidos por alanina causa un incremento significativo en la activación de  $\alpha$  (Boldyreff y col., 1994 a ). Por otro lado, Leroy y col., 1994, demostraron mediante experimentos de unión por fotoafinidad que la espermina se une a esta región, estando implicada entonces en la unión de efectores polibásicos.

Todas las subunidades  $\beta$  presentan un motivo conservado CPX3CX22CPXC, las posiciones relativas de estas cuatro cisteínas permitirían la formación de “dedos de zinc” (Cys 109 y Cys 114, Cys 137 y Cys 140). El significado que estas cisteínas pueden tener para la CK2 no se ha dilucidado todavía.

Otro segmento localizado en la región C terminal de esta subunidad es predominantemente básico -TPKSSRHHHTDG- posiciones 145-156 y en él se encuentran los sitios putativos de fosforilación por cdk (treonina 145) y PKA, (treonina 154). No se sabe aún si estas fosforilaciones ocurren. En contraste, se describió la fosforilación de la serina 209 por la quinasa dependiente de ciclinas cdc2 (Litchfield y col., 1991). El significado de esta fosforilación permanece sin aclarar.

Las características estructurales que se mencionaron anteriormente se resumen en la figura I-2



**Figura II Estructura primaria de la subunidad  $\beta$  de la quinasa de proteínas CK2**

Sobre la estructura primaria conocida de la subunidad  $\beta$  de la quinasa de proteínas CK2 humana se indican las regiones que están implicadas en funciones específicas. Los números arábigos indican la posición de los residuos dentro de la secuencia. Los aminoácidos se indican con el código de una letra, la x significa un residuo cualquiera.

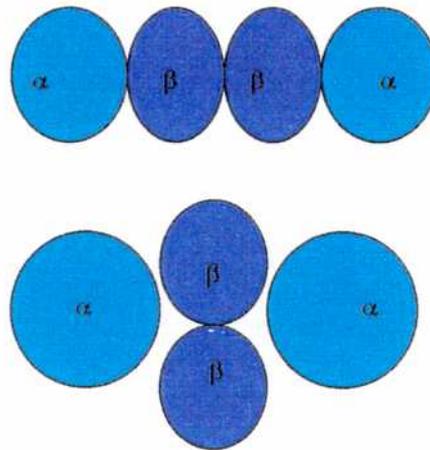
### **2.5.3 Interacción de las subunidades**

Como ya se mencionó anteriormente la actividad de las subunidades catalíticas de la CK2 es modulada por las subunidades  $\beta$ . Más aún, en presencia de la subunidad  $\beta$  la subunidad catalítica presenta mayor estabilidad térmica, sensibilidad a poliaminas y su actividad hacia la mayoría de los sustratos se ve aumentada (Filhol y col., 1991; Meggio y col. 1992; Boldyreff y col., 1993 ; Bidwai y col., 1993).

Se realizaron numerosos estudios con el objetivo de identificar las regiones de contacto entre las subunidades. Trabajos de Lichtfield y col., 1996; y Boldyreff y col.,

1996, utilizando el sistema de doble híbrido (Fields y Song, 1989) indican que las subunidades catalíticas no son capaces de interactuar entre ellas, mientras que sí pueden hacerlo con la subunidad  $\beta$ . La subunidad  $\beta$  por su parte es capaz de formar dímeros. Los residuos comprendidos entre las posiciones 155-170 serían necesarios para la dimerización y la interacción con las subunidades catalíticas (Boldireff y col., 1996; Marin y col., 1997).

El modelo aceptado hasta este momento se representa en la **figura I-3**, primero existiría una dimerización de las subunidades  $\beta$  y luego se unirían las subunidades  $\alpha$ .



**Figura I-3** Modelo hipotético para el heterotetrómero de la CK2 humana, basado en los experimentos de doble híbrido mencionados en el texto. En un primer paso se postula la formación de un dímero  $\beta$ - $\beta$ , seguido por la asociación de las subunidades  $\alpha$  o  $\alpha'$ .

## **2.6 Interacción de la CK2 con diferentes proteínas**

Esta bien establecida la capacidad de la CK2 de asociarse con diferentes proteínas. Numerosos sustratos copurifican o interactúan con la enzima *in vitro*. Como ejemplos pueden mencionarse la topoisomerasa II (Cochrane y col., 1989), p53 (Cochrane y col., 1989b), pp49 (Hauber y col., 1988), hsp90 (Marin y col. 1986), el factor de transcripción ATF/E4TF3 (Tadashi y col. 1996), el complejo multicatalítico proteasoma 20S (Ludemann y col. 1993).

Recientes reportes indicarían la existencia de funciones independientes para la subunidad  $\beta$ . Como ejemplos pueden citarse: 1- el trabajo de Chen y col., (1997), donde se demuestra que la subunidad  $\beta$  es capaz de unirse a la quinasa de proteínas Mos inhibiendo su capacidad de activar a la MAPK. 2- experimentos de Kim y col., (1996) utilizando la técnica de doble híbrido mostraron que la proteína ribosomal L5 interactúa con la subunidad  $\beta$ . 3- Hagemann y col., (1997) utilizando también el sistema de doble híbrido demostraron la asociación de la subunidad  $\beta$  con la quinasa de proteínas A-Raf. Más interesante aún, la coexpresión de ambas en células Sf9 produce una activación notable de la quinasa A-Raf, efecto que es revertido por la subunidad  $\alpha$ .

En cuanto a la subunidad  $\alpha$ , se encontró que es capaz de interaccionar específicamente con la fosfatasa de proteínas 2A inhibiendo de esta forma la quinasa de quinasa de proteínas activada por mitógenos (MEK), (Heriche y col., 1997).

Por otro lado, estudios recientes permitieron identificar proteínas que podrían tener el mismo efecto de la polilisina, paradigmático activador no fisiológico de la CK2 *in vitro*. Así, trabajos de Lee y col., (1997); demostraron que la asociación con la subunidad  $\beta$  de una proteína ribosomal fuertemente básica, la L41, estimula la fosforilación de la DNA topoisomerasa II  $\alpha$ . Asimismo la región C terminal de la p53, fuertemente básica, es capaz de unirse a la subunidad  $\beta$  de la CK2 y estimular la fosforilación del producto del oncogen MDM2, mimcando el efecto que se observa *in vitro* con la polilisina (Guerra y col., 1997).

Otro ejemplo de este fenómeno se da con el factor de crecimiento de fibroblastos-2, el cual se une a la subunidad  $\beta$  y estimula de esta forma la actividad de la quinasa sobre la nucleolina (Bonnet y col. 1996). Por otro lado, Gotz y col., (1996), describieron la unión de la proteína p21WAF1/CIP1, (proteína regulatoria que interactúa con quinasas dependientes de ciclinas, inhibiéndolas); a la subunidad  $\beta$  de la CK2 inhibiendo la fosforilación de un péptido C-terminal de la p53 y de la caseína.

Aunque aún se desconocen los factores que regulan la actividad de la CK2 *in vivo* todas estas evidencias sugieren una regulación de la CK2 vía interacción con diferentes proteínas.

## **2.7 Roles fisiológicos de la CK2**

Tanto la ubicuidad de esta enzima como la gran conservación de su estructura a nivel evolutivo y la gran cantidad de sustratos fisiológicos, permiten relacionar a la CK2 con funciones esenciales y adjudicarle un rol fundamental en el ciclo celular.

Estudios genéticos y bioquímicos demuestran un requerimiento de la CK2 en al menos cuatro funciones celulares: expresión génica, progresión del ciclo celular, crecimiento polarizado y regulación de la homeostasis iónica.

Trabajos realizados en 1990 (Padmanabha, 1990) demostraron que la disrupción conjunta de los genes que codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  de la CK2 de *S. cerevisiae* hacen inviables a las células, este fenotipo pudo ser rescatado al transformar estas células con la subunidad  $\alpha$  de *D. melanogaster*, sugiriendo así una conservación de la actividad de la CK2 a través de la evolución. Con la utilización de mutantes termosensibles de estas subunidades (Hanna y col., 1995) se demostró que la actividad de CK2 es necesaria para la progresión del ciclo celular de G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub> de G<sub>2</sub> a M en *S. cerevisiae*.

Estudios moleculares en *S. pombe* corroboraron que la CK2 cumple un rol crucial en la morfogénesis y crecimiento celular (Snell y Nurse, 1994; Roussou y Draetta, 1994).

El rol de la CK2 en el crecimiento polarizado se ve reforzado por estudios en células de neuroblastoma, donde la inhibición por ARN antisentido de la actividad de la enzima produce una inhibición de la neuritogénesis (Ulloa y col., 1993).

La disrupción de los genes que codifican para las subunidades  $\beta$  y/o  $\beta'$  en *S. cerevisiae* no es letal pero produce un fenotipo sensible a Na<sup>+</sup> y Li<sup>+</sup> (Bidwai y col., 1995), este comportamiento es diagnóstico de un defecto en la homeostasis del Na<sup>+</sup> e implica que la CK2 afecta la entrada, la salida (o ambos procesos) del Na<sup>+</sup> a la célula.

Por otro lado la expresión de la subunidad  $\alpha$  de la CK2 en linfocitos de ratones transgénicos ocasiona la producción estocástica de linfomas. La coexpresión de esta subunidad con un transgén para c-myc produce una leucemia linfocitaria aguda (Seldin y Leder, 1995). Los linfocitos provenientes de estos animales proliferan anormalmente en cultivo. Por otro lado, la inhibición por ARN antisentido o por anticuerpos de la actividad de CK2 en células quiescentes previenen la proliferación celular inducida por mitógenos (Pepperkok y col. 1991; Lorenz y col. 1993). Todos estos resultados son consistentes con el requerimiento de la actividad CK2 para la progresión del ciclo celular.

### **3. Identificación de sustratos de la CK2**

Como se mencionó anteriormente se conocen en organismos eucariotas superiores más de 100 sustratos de la CK2 y su número sigue aumentando. Entre los más recientes se encuentra el proteasoma 20S (Castaño y col., 1996). Por el contrario, en eucariotas inferiores los sustratos identificados son muy pocos (Glover, 1998). La identificación y el análisis de los sustratos de esta enzima es fundamental para definir el o los roles fisiológicos en los cuales participa.

### **3. Proteasoma 20S**

El proteasoma 20S es el “core” catalítico del complejo multicatalítico 26S principal responsable de la vía no lisosomal de degradación de proteínas, que cumple un rol central en el metabolismo celular (Ciechanover, 1994; Hilt and Wolf, 1995; Hochstrasser, 1995; Phal y Baeurele, 1996).

El proteasoma 20S es un complejo multicatalítico de gran masa molecular (680 kDa) presente en el citosol y en el núcleo de todas las células eucariotas (para revisiones recientes ver Hilt y Wolf, 1995; Coux y col., 1996). El proteasoma 20S presenta una estructura cilíndrica constituida por cuatro anillos superpuestos compuestos por al menos 14 subunidades relacionadas (25-30 kDa) que pueden ser clasificadas del tipo  $\alpha$  o del tipo

$\beta$  de acuerdo a la relación que guardan con los dos tipos de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  presentes en el proteasoma más simple de la arqueobacteria *Thermoplasma acidophilum* (Zwickl y col., 1992). En los proteasomas eucariotas los anillos externos contienen siete subunidades del tipo  $\alpha$  y los anillos internos siete subunidades del tipo  $\beta$ , exponiendo los sitios activos hacia la cara interna del cilindro. La cristalografía del proteasoma 20S de *S. cerevisiae* muestra que cada una de las subunidades ocupa una posición única dentro del anillo (Groll y col., 1997).

Los cambios en la composición de subunidades (Haas y Kloetzel, 1989; Akiyama y col., 1994; Jones y col., 1995) y localización subcelular (Haas y col., 1989; Amsterdam y col., 1993) así como la existencia de numerosos factores que regulan la actividad del mismo (Peters, 1994) indican que su función está fuertemente regulada. Se demostró la fosforilación *in vivo* del proteasoma 20S de numerosas fuentes (Haas y Koetzel, 1989; Arrigo y Mehlen, 1993; Wehrem y col., 1996). Se demostró también que la CK2 es responsable de la fosforilación *in vitro* (y probablemente *in vivo*) de las subunidades C8 y C9 del proteasoma proveniente de tejidos de mamíferos (Castaño y col., 1996) y de la subunidad C2 del proteasoma de arroz (Umeda y col., 1997). En nuestro laboratorio hemos demostrado que el proteasoma 20S de *S. cerevisiae* puede ser fosforilado *in vitro* en la subunidad  $\alpha7/C8$ , la cual está fosforilada *in vivo* (Pardo y col., 1998).

## **4. Organismo**

### **4.1 Introducción a *C. albicans***

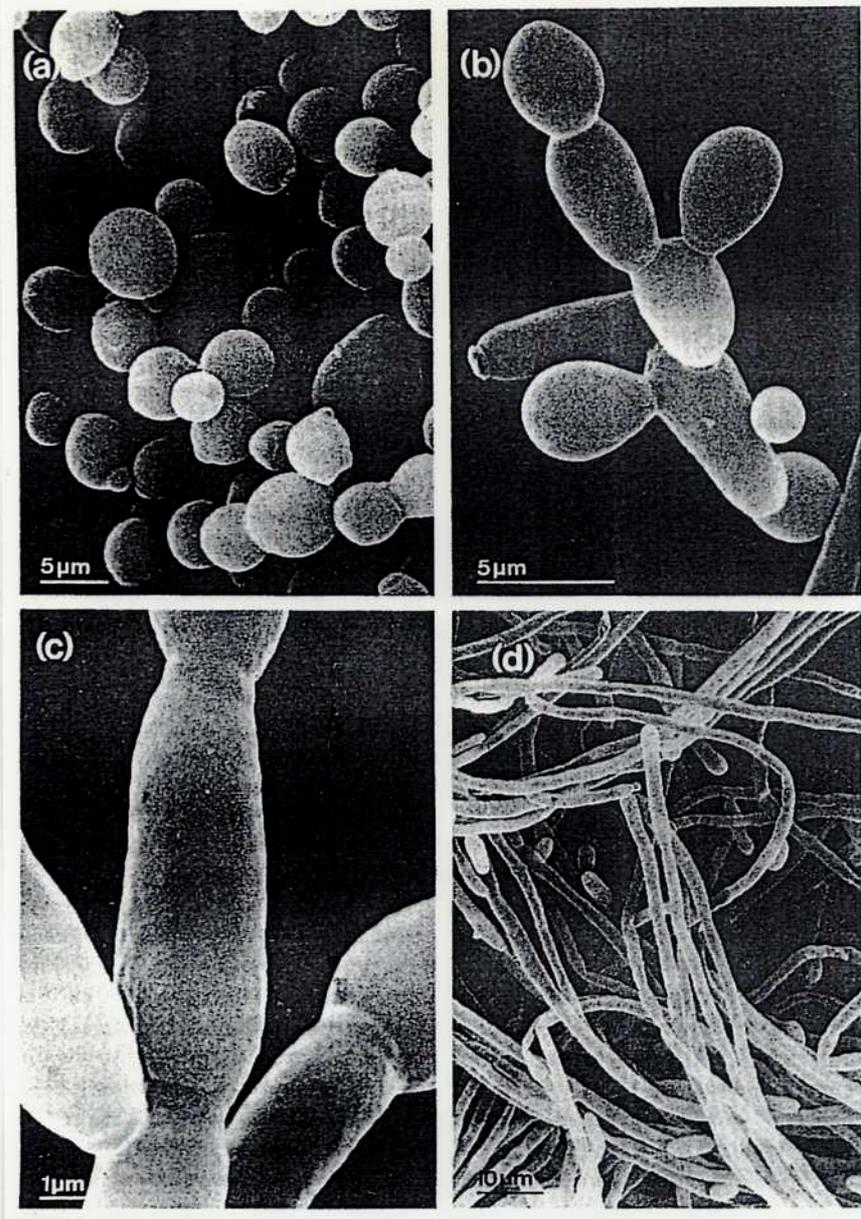
*Candida albicans* es un hongo dimórfico patógeno oportunista de vertebrados, causante de la micosis de incidencia mundial más común entre los seres humanos: la candidiasis.

Este hongo es un comensal habitual de tractos respiratorio, gastrointestinal, genital y menos frecuentemente de la piel. La mayoría de las personas son portadoras sanas, sin embargo, bajo determinadas condiciones se torna infeccioso provocando candidiasis.

La enfermedad causada por este hongo puede presentarse con distintos grados de severidad, existiendo tres tipos básicos de infecciones: superficiales, localmente invasivas y sistémicas. Las infecciones superficiales son las más comunes, se producen en las mucosas de la cavidad oral, tracto respiratorio y la piel. La candidiasis localmente invasiva ocurre en pacientes inmunocomprometidos y se encuentra frecuentemente como ulceraciones del tracto intestinal, respiratorio, intestinal o génito urinario. La candidiasis sistémica es la variedad más severa e involucra la infección invasiva del parénquima de los órganos viscerales como el corazón, los riñones, el hígado, el bazo, los pulmones y el cerebro (Odds, 1979; Dei-Cas y Vernes, 1986).

La incidencia de la candidiasis sistémica ha aumentado en forma continua en los últimos veinte años debido a depresiones en el sistema inmune causadas por tratamientos de quimioterapia, trasplantes, y especialmente al avance del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Van Brunt, 1987). La candidiasis sistémica es la causante de aproximadamente la cuarta parte de las muertes de los enfermos de SIDA, la misma cifra vale para los pacientes terminales de leucemia, mientras que un tercio de los receptores de trasplantes padecen la enfermedad.

*C. albicans* es un hongo diploide perteneciente al Orden-forma Cryptococcales, Subclase-forma Blastomycetidae, Clase-forma Deuteromycetes, Sub-división Deuteromycotina. Es considerada una levadura imperfecta, ya que se conoce solamente su forma de reproducción asexual, predominantemente por gemación con producción de células esféricas llamadas *blastosporas*. En presencia de ciertas señales inductoras del medio ambiente puede producir formas filamentosas en las cuales las células permanecen unidas unas a otras luego de la división celular formando así largas cadenas. Estas formas filamentosas van desde el rango de *pseudehifas*, donde las células que forman los filamentos son elongadas pero aún elipsoides y presentan constricciones de la pared celular, hasta verdaderas *hifas* o micelio, donde las células de los filamentos son cilíndricas y se encuentran separadas entre si por septos perpendiculares (**figura I-4**)



**Figura I-4**

**Morfologías de *C. albicans*.** (A) *blastosporas*, células esféricas; (B) *pseudohifas*, notar las constricciones de la pared celular mostrando claramente que estas células son cadenas de blastosporas y no verdaderas hifas; (C) en esta pseudohifa la célula está aún más alargada que en (B) y las constricciones de la pared son más pronunciadas; (D) micelio o hifa verdadera, las constricciones de las células en los septos son mínimas o no se observan.

La capacidad de *C. albicans* de adoptar estas diferentes morfologías podría contribuir a la colonización y diseminación dentro de los tejidos del huésped promoviendo la infección (Odds, 1988 y 1994).

En la mayoría de las lesiones establecidas como candidiasis el hongo produce ambas formas (levadura y micelio), de forma tal que la descripción cualitativa de la morfología de *C. albicans* en un tejido no prueba ni descarta la relación entre forma y patogenia (Odds, 1988). Sin embargo parecería ser que la forma miceliana esta involucrada en los estadios tempranos de la invasión penetrando en los tejidos (Anderson y Odds, 1985), adhiriéndose al epitelio (Kimura y col. 1978), y evitando la fagocitosis (Smith, 1985), aunque no existen evidencias concluyentes que muestren que la virulencia sea dependiente de una sola morfología.

El dimorfismo levadura-micelio exhibido por una gran variedad de especies fúngicas puede definirse como el proceso reversible por el cuál el hábito levaduriforme se transforma, por algún cambio en el hábitat natural o en el medio de cultivo, en un hábito miceliano por cambios que se producen a nivel celular (Stewart y Rogers, 1978). Este tipo de diferenciación no es un proceso esencial en el ciclo celular del organismo sino que sería una respuesta a un cambio en el hábitat en el cual se desarrolla.

Es de destacar que la mayoría de las especies fúngicas de importancia clínica son dimórficas, considerándose que la comprensión de este fenómeno es de suma importancia para el control de un grupo de micosis cada vez más relevante, que afectan al hombre y a los animales. La dilucidación de los mecanismos que regulan la transición levadura-micelio podrían ayudar a comprender y controlar la enfermedad y obtener información importante sobre la morfogénesis de hongos como proceso general.

La formación de micelio *in vitro* en *C. albicans* está influenciada por la temperatura, la cantidad de inóculo, la composición del medio y la cepa (Van Rij, 1984).

*In vitro* la transición levadura-micelio es inducida por la incubación del cultivo a 37 °C en presencia de ciertos factores tales como L-aminoácidos (Land y col., 1976), N-acetil glucosamina (Simonetti y col., 1974) y suero. Se demostró también que determinadas

hormonas como la hLH (Kinsman y col., 1988), la hCG (Caticha y col., 1992), la prostaglandina E2 y el neurotransmisor  $\beta$ -endorfina (Kalo Klein y Witkin, 1990) estimulan la transición levadura-micelio.

El avance en el conocimiento de *C. albicans* ha sido lento en relación a otras levaduras por la dificultad intrínseca que trae aparejada la diploidía y la falta de un ciclo sexual. Las dificultades para la manipulación genética de *C. albicans* muy probablemente han impedido la identificación de los factores que contribuyen a la transición dimórfica y al aislamiento y la identificación de mutaciones que afecten su patogenicidad.

Recientemente se ha logrado un importante avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la morfogénesis de *C. albicans* utilizando un abordaje experimental alternativo, el cual se basa en la premisa que la transición de levaduras a formas filamentosas es controlada por vías metabólicas semejantes en todos los hongos a pesar de responder a diferentes señales de inducción. Así se podrían identificar genes requeridos para la morfogénesis en sistemas genéticamente manipulables, clonarlos, disrumpir los genes homólogos de *C. albicans* y determinar si las mutantes son defectivas en la morfogénesis y/o en la patogénesis.

Este abordaje resultó factible a partir del descubrimiento del ciclo filamentoso en *S. cerevisiae*, cuando Gimeno y col. (1992) demostraron que cepas diploides de *Saccharomyces* eran capaces de morfogenizar. Posteriormente se demostró que esta transición dependía de las proteínas Ste20p (factor de transcripción), Ste11, Ste7p y Ste12p, las cuales forman parte de la vía de las MAPK. Las mutantes nulas para estas proteínas son defectivas tanto para el 'mating' como para el crecimiento filamentoso (Liu y col. 1993; Mosch y col., 1996).

Los genes homólogos a STE20, STE7 y STE12 en *C. albicans* (CPH1, HST7 y CST20 respectivamente) se clonaron y se utilizaron para construir mutantes nulas en *C. albicans*.

Las cepas homocigotas para las mutaciones en dichos genes fueron parcialmente defectivas para el desarrollo hifal en medio sólido (Liu y col., 1994; Kohler y Fink, 1996;

Leberer y col., 1996). Sin embargo estas mutantes fueron capaces de filamentar en medio líquido y en respuesta al suero.

Recientemente se demostró que la interrupción del gen TPU1 (que codifica un factor de transcripción), produce un crecimiento pseudohifal en todas las condiciones estudiadas, tanto en medio sólido como en medio líquido (Braun y Johnson, 1997). Stoldt, y col. (1997) encontraron un fenotipo similar al disminuir drásticamente los niveles de un factor de transcripción del tipo c-Myc, el Egl1p. Estos dos factores de transcripción actuarían por la misma vía.

Por otro lado, trabajos de nuestro laboratorio, entre otros, demostraron que el AMPc juega un papel importante en la transición levadura-micelio (Egidy y col., 1989; 1990) y que la cascada del AMPc puede ser activada por hormonas esteroidogénicas y por glucagón (Paveto y col., 1990; Paveto y col., 1991). Más recientemente se ha demostrado que el AMPc y sus derivados, y el glucagón, estimulan la formación de tubos germinativos y que la hormona se une específicamente a las membranas del hongo (Zelada y col., 1996). Por último se logró la inhibición de la morfogénesis mediante la inhibición específica de la actividad de PKA *in vivo* (Castilla y col., 1997).

Los resultados de todos los trabajos mencionados anteriormente son de suma importancia ya que prueban la necesidad de una vía de transducción de señales que determina la activación de factores de transcripción y por otro lado sugiere la existencia de más de una vía que lleva a la inducción del crecimiento hifal ya que la delección de algunos de estos genes sólo afecta la morfogénesis en medio sólido.

De estos estudios podemos concluir que la morfogénesis en *C. albicans* es un proceso complejo, desencadenado por diferentes inductores los cuales muy probablemente utilizan diferentes vías metabólicas para desencadenar la transición dimórfica.

## **OBJETIVOS**

En base a la importancia de la CK2 en procesos proliferativos y su relación con el establecimiento de la forma celular y el crecimiento polarizado se decidió estudiar la enzima de *C. albicans*, su posible relación con el crecimiento y la morfogénesis y su caracterización bioquímica y molecular.

Teniendo en cuenta los pocos sustratos conocidos en eucariotas inferiores sumado al antecedente en mamíferos y en plantas de la fosforilación por CK2 del proteasoma 20S y dado que una línea del laboratorio estudia dicha partícula en *C. albicans* se realizó un estudio de la fosforilación por la CK2 de *C. albicans* sobre la fosforilación del proteasoma 20S del mismo organismo.

A raíz de los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo se consideró pertinente el clonado de la/las subunidades regulatorias de la enzima.

## ***MATERIALES Y METODOS***

## **MATERIALES Y METODOS**

### **1. Crecimiento y mantenimiento de *C. albicans***

#### **1.1 Mantenimiento de la cepa**

Para este trabajo se utilizó la cepa de *Candida albicans* 1001 (ATCC 64385). Esta se mantuvo en pico de flauta en medio Soll y Bedell agarizado, repicándose cada 30 días. Para salvaguardar la cepa de mutaciones espontáneas se la alicuotó en medio Soll y Bedell líquido conteniendo 50 % glicerol y se la mantuvo a -70°C.

La cepa 1001 de *C. albicans* forma actualmente parte del cepario de la cátedra de Micología FCEyN-UBA bajo el código BAFC 734.

#### **1.2 Medio de Soll y Bedell**

El medio de cultivo descrito por Soll y Bedell, (1978), contiene (por litro de agua destilada): glucosa 10 gr; bactopectona 10 gr; extracto de levadura 1 gr;  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 gr;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$  1 gr y  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  2,2 gr.

#### **1.3 Crecimiento de *C. albicans***

Los cultivos de *C. albicans* se llevaron a cabo inoculando medio fresco con una dilución 1/100 a partir de un cultivo levaduriforme en fase estacionaria tardía.

Los cultivos se crecieron a una temperatura de 28-30 °C con agitación orbital (200 rpm) en erlenmeyers (manteniendo una relación atmósfera:medio de cultivo de 4:1), o indistintamente, en una plancha de movimiento lateral en frascos de Fernbach con igual relación atmósfera:medio de cultivo.

#### **1.4 Inducción de la germinación**

La morfogénesis inducida por temperatura se realizó de acuerdo a las descripciones metodológicas de Soll y Bedell (1978). Se creció el cultivo hasta fase estacionaria y se diluyó en el mismo medio recién preparado y precalentado a 37 °C a una concentración final de  $2 \times 10^6$  células por ml. El cultivo se incubó a 37 °C durante 90 min con agitación, obteniéndose un porcentaje de germinación del 100 %. El micelio se cosechó por centrifugación.

## **2. Preparación de extractos de *C. albicans***

En todos los casos se trabajó a 4 °C. Las células de los diferentes estadios mórficos se cosecharon por centrifugación a 3000-5000 rpm por 10 min en centrífuga refrigerada, se lavaron dos veces con agua destilada y una tercera vez con un pequeño volumen de buffer de homogeneización con inhibidores de proteasas.

### **2.1 Extractos solubles para purificación de la CK2**

Las células se resuspendieron en buffer Tris- HCl 10 mM, pH 7,4; EDTA 10 mM; EGTA 10 mM; 2-mercaptoetanol 10 mM; 10 % glicerol e inhibidores de proteasas, (buffer A). Los extractos crudos se obtuvieron por ruptura de las células en un “Bead Beater” (Biospec Products, Bartlesville, OK 74005). Para ello se utilizaron cantidades iguales (en peso) de células y de perlas de vidrio de 500  $\mu$ m de diámetro (Sigma). La ruptura de las células se obtuvo mediante 14 ciclos de ruptura de 1 min cada uno con intervalos entre ellos de 1 a 2 min en hielo. El homogenato se centrifugó a 5000 x g durante 5 min para sedimentar las células enteras. El sobrenadante se recentrifugó a 15000 x g por 20 min. El sobrenadante de esta centrifugación se denominó de aquí en más S15 y se lo utilizó para la puificación de la enzima. Con este método se obtiene un rendimiento aproximado de 10 mg/ml de proteínas totales.

### **2.2 Extactos solubles para medición de la actividad CK2.**

Los extractos solubles para cuantificar la actividad de CK2 en los diferentes tiempos de cultivo, tanto de células levaduriformes como micelio, se llevaron a cabo por vortexeo de las células en presencia de perlas de vidrio. Para ello se agregaron dos volúmenes de perlas de vidrio por cada volumen de células centrifugadas, mas dos volúmenes de buffer A. La ruptura de la células se obtuvo vortexeando la mezcla durante 1 min con intervalos de 2 min en hielo y este ciclo se repitió 10 veces. Finalmente la mezcla se centrifugó a 5000 x g durante 5 min y a 15000 x g durante 20 min. El sobrenadante se utilizó como fuente de enzima.

### 2.3 Inhibidores de proteasas

Los inhibidores utilizados fueron: PMSF 1 mM; leupeptina y antipaina 3µg/ml. Para la medición de la actividad de CK2 en los extractos crudos se agregó 3µg/ml de bestatina (inhibidor de peptidasas).

### 3. Medición de la actividad enzimática de la CK2

La actividad fosfotransferasa de la CK2 se ensayó midiendo la cantidad de fosfato radioactivo incorporado a caseína defosforilada (Gonzatti-Haces, 1982) o al péptido específico: RRRADDSDDDDD (Marin, 1994).

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl conteniendo: Tris-HCl 50 mM pH 7,4; 2-mercaptoetanol 2 mM; Cl<sub>2</sub>Mg 10 mM; ClNa 100 mM; [<sup>32</sup>P] ATP (50 µM ATP, 1-3 x 10<sup>6</sup> cpm por ensayo). La concentración de sustrato presente en el ensayo fue 5 mg/ml para la caseína y 70 µM para el péptido específico. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 10 min a 30 °C. La reacción se detuvo sembrando 40 µl de la mezcla de incubación en papeles de fosfocelulosa de 2cm x 2cm según el método de Roskoski jr. (Roskoski, 1983). Los papeles se lavaron por inmersión en ácido fosfórico 75 mM, tres veces consecutivas agitando suavemente durante 10 min cada vez. Por último los papeles se lavaron con etanol 96 % y se secaron con corriente de aire caliente. La radioactividad

de los mismos se determinó usando una mezcla centelladora de tolueno. En todos los casos las mediciones se realizaron en condiciones de linealidad con el tiempo y con la concentración de enzima.

Una unidad de la actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la transferencia de 1 nmol de fosfato por min a 30 °C utilizando caseína como sustrato.

#### **4. Purificación de la CK2 de *C. albicans***

Todos los pasos se realizaron a 4 °C. La purificación a homogeneidad de la CK2 se realizó a través de 4 pasos de purificación: 1- DE-52; 2- fosfo-celulosa; 3- Q-Sepharosa; 4- heparina-agarosa.

Típicamente en todas las purificaciones realizadas se partió de 200 gr (peso fresco) de células levaduriformes. Para todas las columnas se recogieron fracciones de un centésimo del volumen total de la columna y cada una se ensayó para la actividad de quinasa sobre el péptido específico y caseína de acuerdo a lo descrito en el punto 3.

##### **4.1 DE-52**

La fracción S15 (10 mg/ml) se diluyó hasta que su conductividad fuese igual a la del buffer A y se sembró en una columna de DE-52 (2,5 x 45 cm) previamente equilibrada en el buffer A. La columna se lavó con 5 volúmenes del mismo buffer y con 5 volúmenes más del buffer A que contenía 150 mM de ClNa. La elución de la proteína retenida se realizó con 3 volúmenes de buffer A conteniendo 300 mM ClNa.

##### **4.2 Fosfo-celulosa**

Las fracciones del eluido de la DE-52 que contenían la actividad de CK2 se reunieron y se sembraron en una columna de fosfo-celulosa (0,9 x 8 cm) previamente equilibrada con buffer A conteniendo 300 mM ClNa. La columna se lavó con 5 volúmenes

del mismo buffer y la actividad se eluyó con un gradiente lineal (300-700 mM) de ClNa en buffer A. Las fracciones activas eluyeron a 500 mM ClNa aproximadamente, estas se reunieron y se dializaron contra Tris-HCl 10 mM, pH 8,1 que contenía 2-mercaptoetanol 10 mM, EGTA 4 mM, EDTA 1 mM, inhibidores de proteasas y glicerol 10 % (buffer B).

#### 4.3 Q- Sepharosa

La fracción dializada contra el buffer B se sembró en una columna de Q-Sepharosa (0,5 x 5 cm) previamente equilibrada con el mismo buffer. La columna se lavó con 7 volúmenes del buffer B y la proteína se eluyó mediante un gradiente lineal (10 ml) de Tris-HCl pH 8,1, de 50 a 900 mM en buffer B. Las fracciones que contenían la actividad se reunieron y se dializaron exhaustivamente contra buffer A que contenía 250 mM ClNa.

#### 4.4 Heparina-agarosa

La fracción dializada se sembró en una columna de heparina-agarosa (0,5 x 3 cm) previamente equilibrada en buffer A que contenía 250 mM ClNa y la actividad se eluyó mediante un gradiente lineal (10 ml) de 250 a 1000 mM ClNa. La actividad de CK2 eluyó aproximadamente a 600 mM ClNa. Las fracciones que contenían la actividad quinasa se reunieron, se dializaron contra buffer A y se concentraron hasta un volumen final aproximado de 200 µl en concentradores Microcon 50. La preparación se guardó a 4 °C en alícuotas de 20 µl siendo estable por semanas. Esta preparación se utilizó para los estudios sucesivos.

La enzima de hígado de rata utilizada en algunos de los ensayos fue donada por el Dr. L. A. Pinna, y la subunidad  $\alpha$  recombinante humana fue donada por el Dr. O.-G. Issinger.

### **5. Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) usando como estándar BSA (1mg/ml).

## **6. Estimación de los parámetros estructurales e hidrodinámicos**

### **6.1 Coeficiente de sedimentación. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa**

Para la determinación del coeficiente de sedimentación (s) se utilizó un gradiente lineal de sacarosa de 5 a 20 %, preparado en buffer A conteniendo 250 mM de ClNa, para evitar la agregación de la enzima. El gradiente se construyó depositando en un tubo de 5 ml sucesivas capas de 0,65 ml de soluciones de sacarosa de concentración 20; 17,5; 15; 12,5; 10, 7,5 y 5 % respectivamente, se dejó una hora a temperatura ambiente y al cabo de ese tiempo se colocó en un baño de hielo. Inmediatamente se sembraron 0,2 ml de una mezcla que contenía la enzima y las proteínas marcadoras. El gradiente se centrifugó a 36000 rpm durante 18 horas en un rotor SW 55 Ti. Al terminar la corrida se recolectaron fracciones de 0,2 ml haciendo sifón desde el fondo del tubo y se midió la actividad de CK2 y de las proteínas marcadoras.

Los gradientes de sacarosa utilizados en el estudio de los estados de agregación de la CK2 se realizaron en forma similar, con las adiciones indicadas en la leyenda de la correspondiente figura. Los marcadores utilizados fueron: citocromo c (s: 1,7); peroxidasa (s: 3,5); glucosa oxidasa (s: 8,3).

El coeficiente de sedimentación de la CK2 se determinó de acuerdo a Martin y Ames, (1961).

### **6.2 Radio de Stokes. Tamíz molecular**

La determinación del radio de Stokes se llevó a cabo por filtración molecular en una columna de Sephacryl-300 (1,2 x 80 cm) utilizando una preparación de enzima purificada. La columna se equilibró en buffer A conteniendo 250 mM ClNa y se desarrolló

en el mismo buffer. Se recogieron fracciones de un centésimo del volumen de la columna y se midió actividad CK2.

El volumen de exclusión se determinó con azul de dextrano y la calibración de la columna se realizó utilizando las siguientes proteínas marcadoras : citocromo c (1,8 nm), peroxidasa (3,04 nm), catalasa (5,21 nm),  $\beta$ -galactosidasa (6,8 nm), fibrinógeno (10,7 nm).

El radio de Stokes (a) se determinó gráficamente según el método de Laurent y Killander, (1964).

### 6.3 Estimación del peso molecular de la CK2

El peso molecular de la CK2 se calculó según el método de Siegel y Monty, (1966); usando la siguiente ecuación:

$$PM = [6\pi N \eta_{20,w} / (1-v) \rho_{20,w}] a S_{20,w}$$

donde PM es el peso molecular; N es el número de Avogadro ( $6,02 \times 10^{23}$ );  $\eta$  es la viscosidad del agua a 20°C ( $1,1 \times 10^{-2}$  g/cm seg); v es el volumen específico parcial (se consideró 0,74 ml/g);  $\rho$  es la densidad del agua a 20°C (0,98 g/cm<sup>3</sup>); a es el radio de Stokes ( $10^{-7}$  cm); S es el coeficiente de sedimentación ( $\times 10^{-13}$  seg).

### 6.4 Coeficiente friccional

Para calcular el coeficiente friccional se utilizó el método de Siegel y Monty, (1966). Se aplicó la siguiente fórmula

$$f/f_0 = a [4\pi \eta N / 3v PM]^{1/3}$$

donde  $f/f_0$  es el coeficiente friccional

## **7. Electroforesis en geles de poliacrilamida.**

Las electroforesis en geles 12 % de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), se llevaron a cabo en minigeles siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970). Las muestras se mezclaron con un volumen adecuado de solución de Laemmli (Tris HCl 0,124 M pH 6,8; 2- mercaptoetanol 10 %; glicerol 20 %; SDS 4,6 % y azul de bromofenol 0,01 % y se calentaron durante 5 min a 100 °C. Para visualizar las proteínas se tiñeron los geles con solución teñidora (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1 %; metanol 20 %; ácido acético 40 %) y se destiñeron con solución decolorante (metanol 20 %; ácido acético 40 %). Los geles se secaron al vacío y con calor. Los marcadores de masas moleculares utilizados en la mayoría de los casos fueron: BSA (66 kDa), piruvato quinasa (58 kDa), láctico dehidrogenasa (36,5 kDa), triosa-fosfato isomerasa (26,6 kDa).

Cuando las muestras habían sido fosforiladas en presencia de [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP, la radioactividad incorporada a la proteínas se detectó exponiendo los geles secos a placas radiográficas Agfa Curx RP-1 a -70 °C, utilizando pantalla amplificadora.

La corrida NEPHGE-SDS/PAGE se realizó como está descrito por O'Farrel y col. 1977, utilizando la cuba Bio-Gel Minigel. La primera dimensión se llevó a cabo a 400 V por 4 hrs.

## **8. Ensayos de autofosforilación**

Para los ensayos de autofosforilación las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 10  $\mu\text{l}$ , utilizando la mezcla de reacción descrita en el punto 3, con 50  $\mu\text{M}$  [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP (20000 cpm/pmol) en ausencia de sustrato exógeno. Las incubaciones se realizaron a 4 °C durante 20 min y se detuvieron por el agregado de solución de Laemmli. Para la visualización de las proteínas fosforiladas se procedió como se describió en el punto 7.

## **9. Detección de las subunidades catalíticas de la CK2 *in situ* (geles activos)**

Para la detección de las subunidades catalíticas de la CK2 en geles se utilizó el método descrito por Geahlen, (1986) con las modificaciones de Mizoguchi, (1993). El método consiste esencialmente en la fosforilación de un sustrato previamente polimerizado en el gel.

Los geles utilizados se prepararon de acuerdo a Laemmli, (1970), excepto que previamente a su polimerización se agregó 2 mg/ml de caseína defosforilada.

Como fracciones enzimáticas se utilizaron alícuotas que contenían cada una de ellas 0,25 U provenientes indistintamente de los dos últimos pasos de la purificación.

Luego de la corrida, el gel se lavó con 2-propanol 20% (v/v) para extraer el SDS, y con Tris-HCl 50 mM, pH 8 para extraer el 2-propanol. Las proteínas se desnaturalizaron completamente por incubación del gel en una solución de cloruro de guanidina 6 M; Tris-HCl 50 mM, pH 8; 2-mercaptoetanol 5 mM; durante 2 hr a temperatura ambiente. Luego se procedió a la renaturalización de las proteínas sumergiendo el gel en una solución que contenía Tween 40, 0,05 %; Tris-HCl 50 mM, pH 8; 2-mercaptoetanol 5 mM; a 4 °C durante 18 hrs, con dos cambios del buffer.

Posteriormente el gel se incubó durante 1 hr a 30 °C con suave agitación con 25 ml de la mezcla de reacción de quinasa (Tris- HCl 40 mM, pH 8; ClNa 50 mM; ClK 20mM; Cl2Mg 10 mM; EGTA 0,1 mM; 2-mercaptoetanol 2 mM; ATP 50 μM, 100 μCi [ $\gamma^{32}P$ ] ATP). Una vez finalizado el período de incubación el gel se fijó y se lavó exhaustivamente con la solución detenedora: TCA 5%, pirofosfato de sodio 1%. El gel se secó y las bandas radioactivas se visualizaron como se describió en el punto 7.

## **10. Técnica de western blot**

La técnica utilizada para la detección inmunológica de las proteínas de interés sobre membranas de nitrocelulosa o PVDF se realizó según el protocolo que se detalla a continuación.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (0,22  $\mu\text{m}$  de Sigma) o PVDF (Immobilon-P SQ, Millipore) por transferencia semi seca con una solución conteniendo Tris base 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037 % y metanol 20% durante 45 min a 2 mA/cm<sup>2</sup>.

Las membranas se incubaron durante 1 hr a temperatura ambiente con PBST-leche (buffer fosfato 10 mM pH 6,8; ClNa 0,9%; Tween 20 0,05 % y leche en polvo descremada 5 %) y a continuación con el anticuerpo primario diluido en PBST durante toda la noche a 4 °C.

Una vez finalizada la incubación las membranas se lavaron 4 veces durante 15 min cada vez con PBST y luego se incubaron durante 2 hrs a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo, anti IgG de conejo biotinilado, diluido 1:3000 en el mismo buffer.

Al término de la incubación las membranas se lavaron 3 veces durante 15 min cada vez con PBST y se incubaron con un complejo avidin-peroxidasa, siguiendo las instrucciones del fabricante (Vectastain kit de Vector Laboratories). Por último se lavaron las membranas 3 veces con PBST y 1 vez con PBS.

Los inmunocomplejos se visualizaron utilizando como sustrato cromogénico el 4-cloro-1 $\alpha$ -naftol (27 mg disueltos en 5,7 ml de metanol frío mezclados inmediatamente antes de usar con 28 ml de PBS conteniendo de 71  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 %).

Cuando se utilizó el suero monoclonal el segundo anticuerpo utilizado fue anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina.

Los anticuerpos primarios utilizados para la identificación de las subunidades de la CK2 fueron:

- Suero policlonal de conejo levantado contra la subunidad  $\alpha$  de la CK2 de *D. melanogaster*
- Suero policlonal de conejo levantado contra la subunidad  $\beta$  de la CK2 de *D. melanogaster*
- Suero policlonal de conejo levantado contra la subunidad  $\alpha'$  (35kDa) de la CK2 de *S. cerevisiae*
- Suero policlonal de conejo levantado contra la subunidad  $\beta'$  (32kDa) de la CK2 de *S. cerevisiae*.

Estos sueros fueron cedidos por el Dr. C.V.C. Glover, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Georgia.

El anticuerpo para detectar la subunidad fosforilada del proteasoma 20S:

-suero monoclonal anti subunidad C8 del proteasoma humano (MCP72), cedido por el Dr. K. B. Hendil, Universidad de Copenhague, Dinamarca.

## **11. Determinación del aminoácido fosforilado**

Para este análisis se fosforiló 1 mg de caseína en un volumen final de 20  $\mu$ l con una cantidad apropiada de CK2 en las condiciones estándar a excepción de la actividad específica del [ $\gamma^{32}$ P] ATP en el ensayo se aumentó a 5000 cpm/pmol y del tiempo de incubación que se extendió a 45 min.

La caseína fosforilada se separó en SDS-PAGE 12,5 % y luego se electrotransfirió a una membrana de inmobilon. Las bandas de caseína se identificaron por autorradiografía, se recortaron y se hidrolizaron con ClH 6N durante 1,5 hrs a 110 °C. Se tomó el sobrenadante y el HCl se removió completamente por evaporaciones sucesivas bajo presión reducida. Los productos de hidrólisis se resuspendieron en 10  $\mu$ l de agua y se analizaron por electroforesis bidimensional en placas de celulosa. Las muestras se corrieron en presencia de una mezcla de fosfoserina, fosfotirosina y fosfotreonina no radioactivos usadas como marcadores internos. La primer corrida de la electroforesis fue a pH 1,9 en buffer ácido fórmico 88 %: ácido acético glacial: agua (50:156:1794) durante dos hrs a 300 V. La segunda dimensión se corrió a pH 3,5 en buffer piridina:ácido acético glacial: agua (10:100:1890) durante 1 hr a 300 V, tal como está descrito por Pardo y Moreno, (1988).

Los estándares se localizaron por tinción con ninhydrina y el  $^{32}$ P se visualizó por autorradiografía.

Cuando se determinaron los aminoácidos fosforilados en el proteasoma 20S, 2,7 µg de sustrato se fosforilaron con CK2 homóloga en presencia de [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>]ATP y 1 µM de polilisina.

## **12. Fosforilación del proteasoma 20S por CK2**

Los ensayos de fosforilación estándar se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µl conteniendo 18-20 nM de proteasoma 20S, Tris-HCl pH 7,4 50 mM; Cl<sub>2</sub>Mg 10 mM, ClNa 100 mM; 2-mercaptoetanol 2 mM; leupeptina 100 µg/ml; quimostatina 100 µg/ml; Cbz-L-L-Lal 2 µM; polilisina 2 µM y CK2 de *C. albicans* (4 miliunidades). La mezcla se preincubó por 10 min a 0 °C y la reacción se inició adicionando 0,1 mM [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>]ATP (20000 cpm/pmol). Cuando se utilizó la subunidad  $\alpha$  recombinante humana (rhCK2- $\alpha$ ) como fuente de enzima, el ClNa y la polilisina se omitieron en el ensayo. Las incubaciones se llevaron a cabo por 2 hrs y se frenaron con el agregado de solución de Laemmli 2 x. Las mezclas se resolvieron en SDS-PAGE 15 %, y la fosforilación se visualizó por autorradiografía. Para la cuantificación del P<sup>32</sup> incorporado las bandas fosforiladas se escindieron del gel y la radioactividad se estimó con mezcla centelladora.

## **13. Cultivo de la cepa de *E. coli***

Para los experimentos donde se debía transformar *E. coli* la cepa utilizada fue XL1-Blue MRF' cuyo genotipo es {rec A1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI $\Delta$ QZ $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>}

### **13.1 Medio LB (Luria-Bertani)**

El medio de cultivo descrito por Luria y Bertani contiene: ClNa 10 g, triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, por litro de agua destilada. Se lleva a pH 7 con NaOH 5 N.

Cuando el medio utilizado fue LB-ampicilina, la concentración final del antibiótico fue 50 µg/ml

## **14. Aislamiento de ADN**

### **14.1 ADN genómico de *C. albicans***

Para aislar ADN genómico de *C. albicans* se utilizó el siguiente protocolo:

Las células provenientes de un cultivo de 40 ml de *C. albicans* de toda la noche (fase logarítmica de crecimiento) se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm por 5 min y se lavaron dos veces con agua destilada. Se resuspendieron las células en 3 ml de sorbitol 0,9 M; EDTA pH 7,5 0,1 M; se agregó zymolaza 2,5 mg/ml y RNAsa 1 mg/ml y se incubó a 37 °C por 1 hr, para permitir la formación de protoplastos.

Los protoplastos colectados por centrifugación a 5000 rpm x 5min se resuspendieron en 5 ml de Tris-HCl pH 7,4 50 mM; 20 mM EDTA. Se agregaron 0,5 ml SDS 10 % y se incubaron a 65 °C por 30 min, para producir su lisis. Cumplido el tiempo de incubación se agregó 1,5 ml de acetato de potasio 5 M y la mezcla se dejó en hielo durante 60 min. Al cabo de este tiempo, la suspensión se centrifugó a 10000 rpm x 10 min y el sobrenadante que contiene el ADN se transfirió a un tubo limpio y se precipitó con fenol:cloroformo (ver 14.3).

El precipitado del lavado con etanol 70 % se resuspendió en agua MilliQ. El ADN se cuantificó utilizando el Gene Quant (Pharmacia Biotech) y se guardó alicuotado a -20 °C hasta ser utilizado en las reacciones de PCR.

El ADN genómico de *S. cerevisiae* se obtuvo siguiendo el mismo protocolo.

### **14.2 Mini preparación de ADN plasmídico**

Para obtener mini preparaciones de ADN plasmídico bacterias transformadas con el plásmido de interés se crecieron en 3 ml de medio LB suplementado con 50 µM ampicilina a 37 °C con agitación durante toda la noche.

Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4000 rpm por 5 min y el precipitado se resuspendió en 100 µl de buffer TGE (Tris-HCl pH 8 25 mM; glucosa 50 mM; EDTA 10 mM; 2 µl de RNAsa 10 mg/ml). Se agregaron 200 µl de NaOH 0,2 N; SDS 1 % y la suspensión se agitó suavemente por inversión. Se agregaron 500 µl de acetato de potasio 3 M pH 5,2 y la mezcla se agitó con vortex durante 2 seg. Los tubos se centrifugaron 10 min a 10000 x g, y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio donde se realizó la precipitación con fenol:cloroformo (ver 13.3). Las muestras se resuspendieron en 40 µl de agua MilliQ y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

Alternativamente, cuando las mini preparaciones se obtuvieron para secuenciación del ADN se utilizó el sistema Wizard Plus SV de Promega siguiendo las especificaciones del fabricante.

#### 14.3 Precipitación con fenol:cloroformo

La precipitación con fenol:cloroformo se realizó de la siguiente manera:

Al sobrenadante acuoso que contiene el ADN a precipitar se le agregó un volumen de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico (25-24-1). Las fases se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 7000 xg por 5 min. Se tomó la fase acuosa y se le agregó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24/1), se mezcló por inversión y la suspensión se centrifugó nuevamente a 7000 x g por 5 min. Se tomó la fase acuosa y se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto. La suspensión se centrifugó a 10000 x g por 10 min.

El precipitado de ADN se lavó con 200 µl de etanol 70 % y se centrifugó a 7000 x g por 10 min. Se volcó el sobrenadante y el precipitado se secó con bomba de vacío y se resuspendió en agua MilliQ en el volumen deseado en cada caso.

### 15. Amplificación por PCR

#### 15.1 Diseño de los primers

Con el objetivo de amplificar un fragmento de el/los genes de la/las subunidades regulatorias de la CK2 de *C. albicans* se analizaron las secuencias conocidas hasta el momento de las subunidades  $\beta$  clonadas. Se diseñaron primers degenerados para amplificar por PCR un fragmento que incluye una región altamente conservada de las subunidades  $\beta$  (ver figura R-19) que comprende desde el aminoácido 80 hasta el aminoácido 170 de la subunidad  $\beta$  humana. Los primers P1 y P2 se pensaron para que incluyeran solo esta zona ya que las subunidades que se identificaron por anticuerpos en la enzima de *C. albicans* parecen ser mucho mayores que las subunidades  $\beta$  encontradas hasta el momento. Por el análisis de las secuencias de las subunidades  $\beta$  conocidas se puede pensar que las inserciones que darían cuenta del mayor peso molecular en las subunidades de *C. albicans* estarían en las regiones N y C terminal de las proteínas.

Las secuencias de los primers P1 y P2 pueden verse en la **tabla M-I**.

**Tabla M-I** *Secuencias de los primers utilizados*

primer	secuencia	largo (pb)	grado de degeneración	falta de apaream. en 3'	Posición en el gen a
P1	TTR TAY GGW TTR ATH CAT GCH	21	114	si	79-85
P2	DGT HCC AAA RTA DGC WCC DTC	21	648	no	155-161
P5	TTA CTC GCT GGC CAT TGT TCG ATC	24	-	no	-

<sup>a</sup> La posición en el gen se refiere a la ubicación que tienen los primers usando como numeración la secuencia de la subunidad  $\beta$  de la CK2 humana.

La nomenclatura utilizada es: R: A o G; Y: C o T; W: A o T; H: A, C o T; D: A, G o T.

Para minimizar el grado de degeneración de los primers P1 y P2 se eligieron los codones que formarían parte de los mismos en base al uso de codones en *C. albicans* (**tabla M-II**). Por ejemplo, en la posición 1 del P1 hay una leucina (L). Este aminoácido,

en *C. albicans*, es codificado por cinco codones diferentes, con cambios en la segunda y en la tercera posición. Una forma de bajar la degeneración sería hacer diferentes grupos de primers que contuvieran una u otra subfamilia de codones. Se decidió intentar primero con los codones que son usados con mayor frecuencia en *C. albicans*, restringiendo la síntesis de los primers a los codones más probables. Así, la leucina finalmente quedó representada solo por los codones UUA y UUG que son los de uso mas frecuente en *C. albicans*, dejando de lado los codones CUU, CUC, CUA y CUG por ser los menos probables.

En el caso de la posición 1 del primer P2 se decidió abarcar dos posibilidades diferentes: que ese aminoácido fuera glutámico (D) o aspártico (E), ya que en esa posición en *S. cerevisiae* el gen *ckb1* que codifica para la subunidad  $\beta$  tiene una E en vez de la D que presentan todas las demás subunidades  $\beta$  de la CK2 (ver figura R-18). Se aprovechó el hecho que estos dos aminoácidos están codificados por codones que difieren sólo por un cambio en la tercera base de tal manera que el primer P2 llevaba las dos posibilidades.

**Tabla M-II Uso de codones en *C albicans*.**

UUU F 26.4 ( 3061)	UCU S 24.9 ( 2884)	UAU Y 24.7 ( 2865)	UGU C 10.4 ( 1201)
UUC F 16.7 ( 1938)	UCC S 10.7 ( 1235)	UAC Y 11.9 ( 1378)	UGC C 1.3 ( 156)
UUA L 34.2 ( 3960)	UCA S 24.4 ( 2832)	UAA * 1.1 ( 131)	UGA * 0.2 ( 22)
UUG L 36.6 ( 4245)	UCG S 5.4 ( 622)	UAG * 0.5 ( 53)	UGG W 11.2 ( 1298)
CUU L 8.6 ( 993)	CCU P 13.6 ( 1578)	CAU H 14.1 ( 1633)	CGU R 6.5 ( 753)
CUC L 1.9 ( 217)	CCC P 3.2 ( 369)	CAC H 5.9 ( 684)	CGC R 0.5 ( 61)
CUA L 2.7 ( 315)	CCA P 29.2 ( 3387)	CAA Q 37.7 ( 4366)	CGA R 3.0 ( 349)
CUG S 2.5 ( 285)	CCG P 2.1 ( 244)	CAG Q 6.0 ( 695)	CGG R 0.6 ( 75)
AUU I 40.4 ( 4683)	ACU T 33.4 ( 3868)	AAU N 37.0 ( 4287)	AGU S 14.7 ( 1703)
AUC I 15.1 ( 1748)	ACC T 14.4 ( 1666)	AAC N 18.7 ( 2166)	AGC S 3.7 ( 427)
AUA I 9.7 ( 1122)	ACA T 14.7 ( 1706)	AAA K 49.1 ( 5691)	AGA R 24.2 ( 2803)
AUG M 18.7 ( 2162)	ACG T 2.6 ( 302)	AAG K 18.4 ( 2134)	AGG R 2.1 ( 246)
GUU V 35.0 ( 4057)	GCU A 34.4 ( 3984)	GAU D 44.3 ( 5137)	GGU G 39.0 ( 4515)
GUC V 11.1 ( 1282)	GCC A 13.7 ( 1590)	GAC D 14.1 ( 1638)	GGC G 4.4 ( 511)
GUA V 6.8 ( 785)	GCA A 13.8 ( 1595)	GAA E 50.9 ( 5905)	GGA G 12.6 ( 1455)
GUG V 8.0 ( 931)	GCG A 1.5 ( 169)	GAG E 8.1 ( 939)	GGG G 7.0 ( 809)

También se utilizaron para la amplificación de diferentes fragmentos los primers universales T7 y T3, y el primer P5 que contiene el primer codón stop de la secuencia de la región 3' del gen.

## 15.2 Reacción de PCR

Para llevar a cabo la reacción de amplificación se utilizó como molde ADN genómico de *C. albicans*, ADN genómico de *S. cerevisiae* o ADN de la biblioteca de ADNcopia construida en  $\lambda$  ZAP II, que fue gentilmente donada por el Dr. Brown (Universidad de Aberdeen, UK). En las leyendas de cada figura se especifica el templado utilizado en cada caso.

La mezcla de reacción fue la siguiente:

buffer PCR 1x  
dNTP 0,2 mM  
Cl<sub>2</sub>Mg 1,5 mM  
mix de primers 1,25  $\mu$ M  
Taq pol 2,5 U/ $\mu$ l  
H<sub>2</sub>O csp 50  $\mu$ L

Los primers utilizados se detallan en cada caso. La cantidad de ADN utilizado como molde en la reacción fue entre 150 a 300 ng.

Los ciclos fueron los siguientes:

95 °C x 3 min	
55 °C x 1 min	40 ciclos
72 °C x 2 min	
94 °C x 45 seg	
72 °C x 5 min	
mantener a 4 °C	

Los productos de reacción se visualizaron mediante la separación de los mismos en geles de agarosa, con bromuro de etidio.

### 15.3 Marcación del fragmento por amplificación por PCR

Cuando la reacción de amplificación se llevó a cabo para obtener un fragmento marcado radioactivamente se procedió como se detalla en el punto 14.2, con la diferencia que la mezcla de dNTP se componía de: d(A,T,G)TP 0,2 mM

d CTP 6,25  $\mu$ M

dCTP [ $^{32}$ P] 50  $\mu$ Ci

### 16. Preparación de células competentes de *E. coli*

Para obtener células competentes de *E. coli* se inocularon 50 ml de LB con células provenientes de una única colonia. Este cultivo se creció durante toda la noche a 37 °C con agitación. Posteriormente se inocularon 400 ml de LB con 4 ml del cultivo anterior y se crecieron las células a 37 °C hasta una DO 590 de 0,375. El cultivo se trasvasó a tubos de 50 ml, estos se dejaron en un baño de hielo durante 10 min y luego se centrifugaron a 1600 x g por 3 min, a 4 °C. Las células se resuspendieron en 10 ml de una solución de Cl<sub>2</sub>Ca (Cl<sub>2</sub>Ca 60 mM, glicerol 15 %, PIPES pH7 10 mM) a 4 °C. Las células se centrifugaron a 1100 x g por 5 min, se resuspendieron en la solución de Cl<sub>2</sub>Ca y dejaron en un baño de hielo por 30 min. Finalmente las células se centrifugaron a 1100 x g por 5 min a 4 °C, se resuspendieron en 2 ml de la solución de Cl<sub>2</sub>Ca, se alicuotaron en fracciones de 250  $\mu$ l y se guardaron inmediatamente a -70 °C hasta su utilización. Las células así obtenidas presentan una eficiencia de transformación de  $2 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por  $\mu$ g de ADN.

## **17. Clonado de los fragmentos amplificados por PCR**

Los fragmentos amplificados por PCR se subclonaron en el vector pGEM-T easy de PROMEGA según las indicaciones del fabricante. De una reacción de PCR se tomaron 25 ng de producto y se mezclaron 1:1 con el vector pGEM-T easy. La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen de 10 µl durante toda la noche a 4 °C. A 50 µl de células competentes de *E. coli* XL1-Blue MRF' (obtenidas como se menciona en el punto anterior) se le adicionaron 3 µl de los productos de la reacción de ligación y las mezclas se incubaron por 20 min en un baño de hielo. Las células se sometieron a un shock térmico incubándolas por 45 seg a 42 °C, inmediatamente después de cumplido ese tiempo las mezclas se incubaron en hielo por 2 min. Finalmente se adicionaron 950 µl de medio LB y se incubaron por 2 hr con agitación a 37 °C. Las células se recuperaron por centrifugación, se resuspendieron en 250 µl LB y se plaquearon en placas de LB ampicilina, pre-plaqueadas con IPTG/Xgal (40 µl de 100 mM y 40 µl de 20 mg/ml respectivamente).

De las colonias seleccionadas al azar de la placa se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico (como se indica en el punto 14.2 de esta sección). Se consideraron positivos los insertos que re-amplificaban un fragmento de 249pb con los primers P1 y P2, y que contenían el tamaño del inserto esperado.

## ***RESULTADOS Y DISCUSION***

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Medición de la actividad de la CK2 durante el crecimiento y la morfogénesis de *C. albicans*

Existe una gran cantidad de evidencias que sugieren un importante rol de la CK2 en los eventos de proliferación celular.

Con el propósito de investigar cuál era el comportamiento de la actividad de CK2 durante el crecimiento y morfogénesis del hongo *C. albicans* se procedió su medición en extractos crudos del hongo.

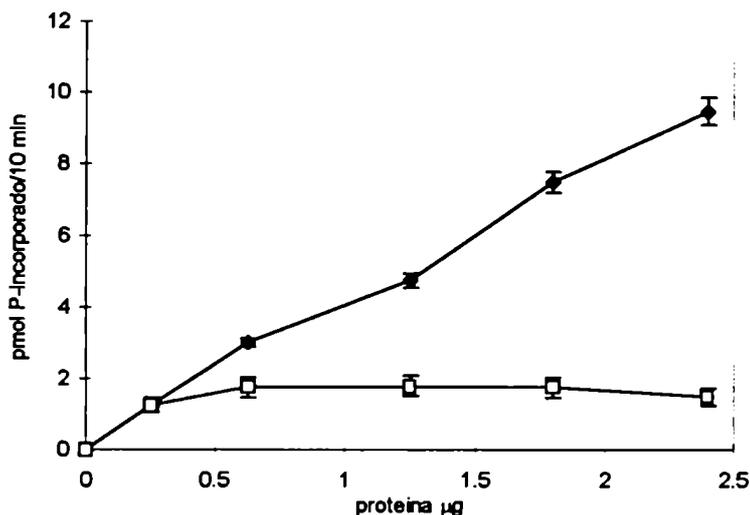
#### 1.1 Medición de la actividad de CK2 en extractos de *C. albicans*

Es bien sabido que la medición en extractos de la actividad de CK2 utilizando caseína como sustrato es muy dificultosa debido a la existencia de una actividad capaz de fosforilar caseína no inhibible por heparina, (probablemente una actividad del tipo CK1).

Recientemente se ha diseñado un péptido sintético RRRADDSDDDDDD (Marin y col., 1994a), que presenta las mejores características para medir la actividad de CK2 debido a su alta afinidad y su estricta especificidad. En nuestro caso, la medición de la actividad en extractos crudos con este péptido, sólo fue posible en presencia de bestatina, un poderoso inhibidor de aminopeptidasas (Umezawa y Aoyagi, 1979). Como puede verse en la **figura R-1**, en ausencia de bestatina la linealidad se perdía rápidamente en función del aumento de la cantidad de proteína del extracto que se ensayaba. Este fenómeno ocurrió especialmente en los cultivos que se encontraban en fase estacionaria de crecimiento, y probablemente se deba a la presencia en los extractos de *C. albicans* de peptidasas que rápidamente hidrolizan el sustrato peptídico.

Trabajos previos del laboratorio demostraron que un sustrato específico para la PKA, LRRASLLG, así como su derivado fosforilado, fueron rápidamente hidrolizados por

una aminopeptidasa presente en los extractos crudos del hongo *Saccobolus platensis* (Silberstein y col., 1990; Fernández Murray y col., 1992).

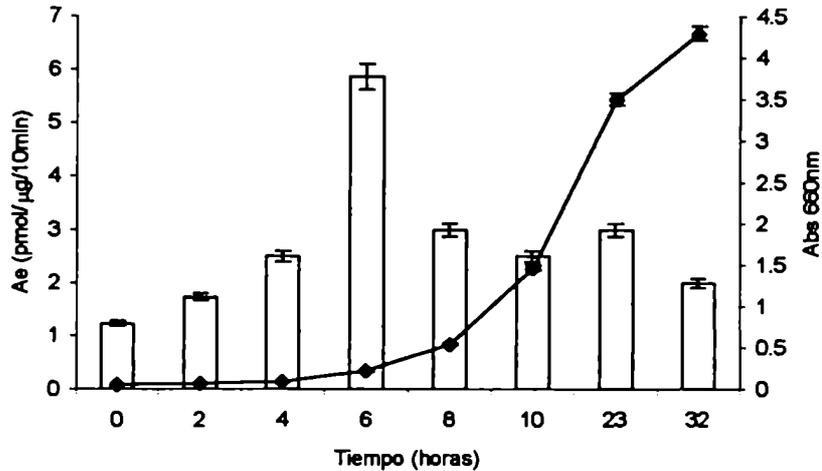


**Figura R-1** Medición de la actividad CK2 en extractos crudos de *C. albicans*

Se determinó la actividad fosfotransferasa de la CK2 en extractos crudos de células levaduriformes de *C. albicans*. Como fuente de enzima se utilizaron cantidades crecientes de extractos crudos provenientes de células levaduriformes de *C. albicans* de cultivos en fase estacionaria de crecimiento. El ensayo de quinasas se llevó a cabo como se detalla en el punto 3 de materiales y métodos, utilizando como sustrato  $70 \mu\text{M}$  del péptido específico RRRADDSDDDDD, en presencia (◆) o en ausencia (●) de bestatina ( $3 \mu\text{g/ml}$ ) en el ensayo. La actividad de quinasas está representada en pmoles de P incorporado/10 min. Las barras indican el error estándar de las medidas de determinaciones realizadas por triplicado en un experimento representativo.

### 1.2 Medición de la actividad de CK2 durante el crecimiento levaduriforme y la morfogénesis de *C. albicans*

La actividad de CK2 se estudió durante el crecimiento levaduriforme de *C. albicans*. La medida de la actividad se relativizó a la proteína total, calculándose entonces la actividad específica (Ae) de la enzima en cada etapa del cultivo.



**Figura R-2: Actividad de la CK2 durante el crecimiento levaduriforme de *C. albicans***

Extractos crudos provenientes de células de diferentes tiempos de cultivo (0, 2, 4, 6, 8, 10, 23 y 32 hrs) se obtuvieron como se detalla en el punto 2.2 de materiales y métodos. La actividad fosfotransferasa de la CK2 se midió como se detalla en el punto 3 de materiales y métodos, utilizando como sustrato exógeno 70  $\mu\text{M}$  del péptido específico, en presencia de 3  $\mu\text{g/ml}$  de bestatina. En la figura se indica la actividad específica de la CK2 (barras) y la absorbancia a 660 nm ( $\blacklozenge$ ) como medida del crecimiento. Las barras de error representan el error estándar de las mediciones hechas por triplicado en un experimento representativo.

Se encontró que la Ae era máxima (5,6 pmol/ $\mu\text{g}$ /10min) en el comienzo de la fase de crecimiento logarítmico mientras que era mínima en fases no proliferativas, como la fase de latencia y la fase estacionaria del cultivo (1,2 pmol/ $\mu\text{g}$ /10min) (ver figura R-2).

Por otro lado se realizaron experimentos comparativos en los cuáles se indujo la morfogénesis temprana del hongo, mediante la dilución de un cultivo estacionario tardío en un medio rico a 37-39  $^{\circ}\text{C}$ , mientras que la misma dilución incubada a 30  $^{\circ}\text{C}$  sirvió como control (ver el punto 1.4 de materiales y métodos). Bajo estas condiciones las células comienzan a morfogenizar entre los 60-90 min post inducción y luego extienden los tubos germinativos.

Como se puede observar en la **tabla R-I** la actividad específica de la CK2 fue similar en todos los tiempos de cultivo ensayados tanto en el cultivo incubado en condiciones de morfogenizar como en el cultivo que se mantuvo levaduriforme.

**Tabla R-I Medición de la actividad de CK2 en condiciones de morfogénesis**

tiempo (min)	% germinación	µg de proteína/µl	Ae(pmol/µg/10min)	
0	0	6,4	1,2 +/- 0,10	30 °C
30	0	8,6	1,5 +/- 0,14	
60	0	8,8	1,6 +/- 0,47	
90	0	11,9	2,1 +/- 0,57	
120	0	10,6	2,9 +/- 0,90	
0	0	6,4	1,2 +/- 0,10	37 °C
30	5	7,8	1,8 +/- 0,36	
60	50	7,6	1,9 +/- 0,65	
90	80	7,8	2,1 +/- 0,62	
120	100	7,6	2,6 +/- 0,69	

A partir de un cultivo estacionario de células de *C. albicans* se inocularon dos cultivos paralelos. Uno de ellos se mantuvo en condiciones de crecimiento levaduriforme, 30 °C, mientras que el otro se incubó a 37 °C, condiciones estas que inducen la morfogénesis del hongo. Se tomaron alicuotas de diferentes tiempos de cultivo y se midió la concentración de proteínas como parámetro de crecimiento y la actividad de CK2 en los extractos crudos, tal como se detalla en el punto 2.2 de materiales y métodos. Los errores están calculados como los desvíos estándar de los valores obtenidos en 3 experimentos independientes.

### 1.3 Integración

Observamos que la actividad específica de la CK2 aumenta en la fase proliferativa del cultivo (crecimiento logaritmico), mientras que en las fases no proliferativas (período de latencia y estacionario), la actividad específica de esta enzima es mínima, en concordancia con los antecedentes previamente mencionados.

Los datos presentados provienen de cultivos parcialmente sincronizados. Cultivos que provienen del inóculo en medio fresco de células en fase estacionaria de crecimiento se hallan sincronizados en la primera división celular (Soll y Bedell, 1978). De esta forma podríamos analogar el pico de Ae de CK2 encontrado en *C. albicans*, al pico observado en *S. cerevisiae* que corresponde al pasaje de G<sub>0</sub> a G<sub>1</sub>. En numerosos trabajos se informa un segundo pico de actividad de CK2 que tendría que ver con el pasaje de S a M. Nosotros no hemos observado un segundo pico, pero esto puede deberse a que ya las células se encuentren en diferentes estadios del ciclo celular y las medidas de actividad representarían un promedio de las actividades de CK2 de cada célula.

Bajo las condiciones experimentales ensayadas no hemos observado diferencias en la Ae de la CK2 durante el establecimiento del crecimiento hifal. Sin embargo, como ya se mencionó en la introducción existen numerosos métodos para inducir la morfogénesis de *C. albicans*, que si bien terminan en la producción de micelio, no tienen pasos iniciales en común. En este trabajo hemos utilizado sólo una forma de inducir la morfogénesis.

## **2. Purificación y caracterización de la CK2 de *C. albicans***

### **2.1 Purificación de la CK2 de *C. albicans***

La CK2 de *C. albicans* se purificó de células levaduriformes como se detalla en el punto 4 de materiales y métodos. Se utilizaron básicamente, tres columnas de intercambio iónico: DE-52, fosfocelulosa, Q-Sepharosa y un paso de cromatografía de afinidad en heparina-agarosa.

El resultado de una purificación típica se resume en la **tabla R-II**. El primer paso del protocolo consistió en la cromatografía del extracto soluble (S 15) en una columna de intercambio aniónico (DE-52). La enzima eluye de esta columna a 300 mM ClNa, y se separa de la mayoría de las proteínas. El pico de actividad obtenido de la elución de la DE-52, medido con caseína como sustrato, es parcialmente inhibido por el agregado de

heparina, indicando que se trataría de una mezcla de CK2 y alguna otra quinasa que puede fosforilar caseína, probablemente una actividad de tipo CK1.

Aprovechando la capacidad de la CK2 de unirse a pH 7,4 tanto a un intercambiador aniónico como a uno catiónico, el eluido de la DE-52 se sembró directamente en una columna de fosfocelulosa. Para la elución de la enzima se aplicó un gradiente lineal de 300 a 700 mM ClNa. En este paso se logran separar dos picos, correspondiendo el que eluye a 500 mM ClNa al que tiene actividad quinasa sobre el péptido específico (resultados no mostrados). El pico conteniendo la actividad CK2 se sembró en un intercambiador catiónico (Q-Sepharosa) a pH 8,1 obteniéndose 818 veces de purificación sin una pérdida importante de la actividad total, con respecto al paso anterior, lográndose la concentración de la enzima. Finalmente la columna de afinidad heparina-agarosa, permitió llegar a 2600 veces de purificación obteniéndose una enzima aparentemente homogénea con un rendimiento aproximado de un 5 %.

**Tabla R-I Purificación de la CK2 de *C. albicans***

Fracción	proteína (mg)	actividad (nmol/min)	act. específica (nmol/min/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	3750	1650 <sup>a</sup>	0,44	1	100
DE-52	38	819	21,6	49	51
P-11	1,2	173,4	144,5	328	11
Q- Sepharosa	0,32	115,2	360	818	7
Heparina- agarosa	0,07	81	1157	2629	5

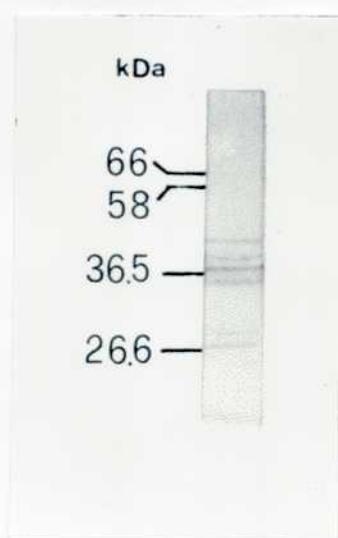
Nota. La actividad de CK2 se midió utilizando el péptido específico como sustrato. P-11 es la columna de fosfocelulosa.

<sup>a</sup> 3 ug/ml de bestatina en el ensayo.

La actividad específica de la CK2 de *C. albicans* es comparable a las ya informadas para otras especies (Glover y col., 1983; Bidwai y col., 1994) sugiriendo que la enzima no se inactiva significativamente durante el proceso de purificación.

Cabe destacar que esta enzima es sumamente escasa en los extractos celulares, lo cual dificulta su purificación en cantidades razonables.

La enzima purificada se analizó en SDS-PAGE 12 % y mediante la tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250 se visualizaron cuatro polipéptidos de masas moleculares aparentes: 44, 39, 37 y 36 kDa respectivamente (**figura R-3**). Para identificar estos polipéptidos con las diferentes subunidades de la CK2 se realizaron una serie de experimentos que se describen más adelante.



**Figura R-3** Análisis en SDS-PAGE de la fracción más purificada de CK2

10  $\mu$ g de proteína del último paso de purificación se resolvieron en SDS-PAGE 12 %. Los polipéptidos se visualizaron por tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250. Las masas moleculares de las proteínas marcadoras se indican en el costado izquierdo.

## 2.2 Caracterización de la enzima

### 2.2.1 Parámetros estructurales

Los parámetros estructurales se resumen en la **tabla R-II**.

Para el cálculo de los parámetros moleculares e hidrodinámicos de la enzima nativa, se utilizaron los datos del coeficiente de sedimentación y radio de Stokes, obtenidos por centrifugación en gradientes de sacarosa y filtración molecular respectivamente.

#### 2.2.1.1 Determinación del coeficiente de sedimentación

Las centrifugaciones en gradientes de sacarosa se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento general descrito en el punto 6.1 de materiales y métodos. Debido a la tendencia que presenta la CK2 a autoagregarse y formar filamentos a baja fuerza iónica los gradientes se realizaron en presencia de 0,25 M ClNa. El coeficiente de sedimentación obtenido fue 6,6 S (**figura R-4 A**).

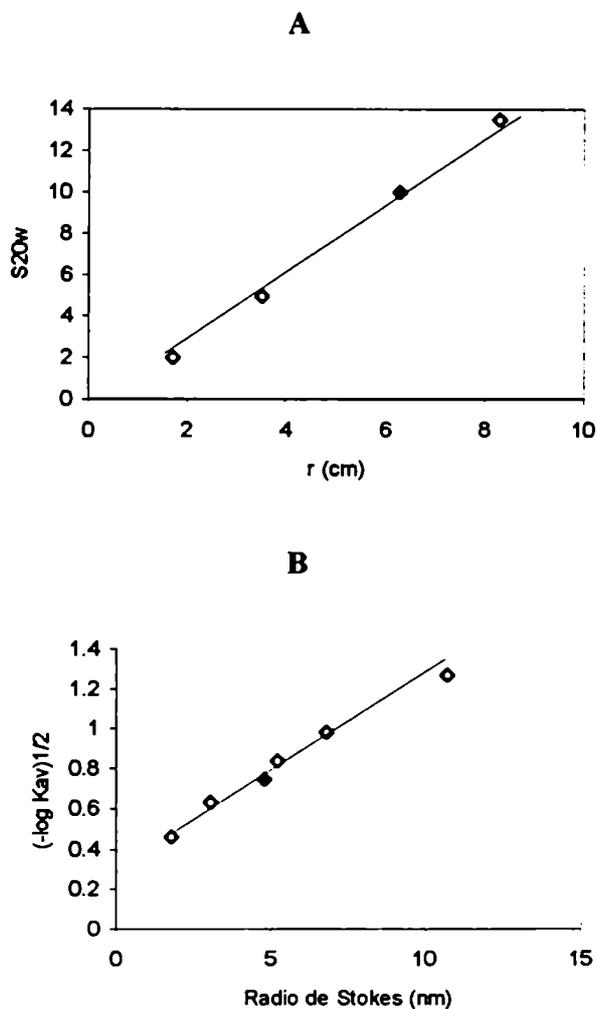
#### 2.2.1.2 Determinación del radio de Stokes

Para determinar el radio de Stokes de la enzima se utilizó la filtración molecular en Sephacryl S-300 como se indica en materiales y métodos, nuevamente en presencia de 0,25 M ClNa. En la **figura R-4 B** se puede ver la relación entre  $(-\log(K_{av}))^{1/2}$  y el radio de Stokes de las proteínas marcadoras. Por interpolación se obtuvo para la CK2 de *C. albicans* un valor del radio de Stokes de 4,9 nm.

#### 2.2.1.3 Determinación del peso molecular de la CK2 nativa

Una vez conocidos el coeficiente de sedimentación y el radio de Stokes de la quinasa y suponiendo un volumen específico parcial semejante al de las proteínas globulares solubles (0,74 ml/g), se estimó el peso molecular de la enzima nativa utilizando la ecuación planteada en la sección 6.3 de materiales y métodos, obteniéndose un valor aproximado de 159 kDa. Este valor resultó compatible con una estructura de

heterotetrámero de la enzima compuesta por los cuatro polipéptidos que se visualizan en la figura R-3.



**Figura R-4** *Determinación del coeficiente de sedimentación y el radio de Stokes de la enzima nativa.*

Panel A: el coeficiente de sedimentación se obtuvo a partir de un gradiente de sacarosa utilizando como estándares glucosa oxidasa (8,3 S), peroxidasa (3,5 S), y citocromo c (1,7 S). Panel B: el radio de Stokes se calculó a partir de una filtración en gel en una columna de Sephacryl S-300 utilizando como estándares fibrinógeno (10,7),  $\beta$ -galactosidasa (6,8), catalasa (5,21), peroxidasa (3,04) y citocromo c (1,8).

#### 2.2.1.4 Determinación del coeficiente friccional

Con el valor del coeficiente de sedimentación y el radio de Stokes se calculó el coeficiente friccional  $f/f_0$  aplicando la fórmula descrita en la sección 6.4 de materiales y métodos.

El valor obtenido fue 1,4 indicando que en presencia de 0,25 M ClNa la enzima en su estado nativo se comporta como una estructura elongada.

**Tabla R-II Parámetros moleculares e hidrodinámicos de la CK2 de *C. albicans***

Radio de Stokes <sup>a</sup>	4,9 nm
Coeficiente de sedimentación <sup>b</sup>	6,6 S
Coeficiente friccional <sup>c</sup>	1,4
Masa molecular de la enzima nativa <sup>c</sup>	159kDa

<sup>a</sup> Estimado por cromatografía en Sephadryl S-300 como se describe en materiales y métodos

<sup>b</sup> Determinado por gradiente de sacarosa como se detalla en materiales y métodos

<sup>c</sup> Calculado a partir de los datos de coeficiente de sedimentación y radio de Stokes utilizando la fórmula que se detalla en materiales y métodos.

#### 2.2.1.5 Identificación de las subunidades de la CK2 de *C. albicans*

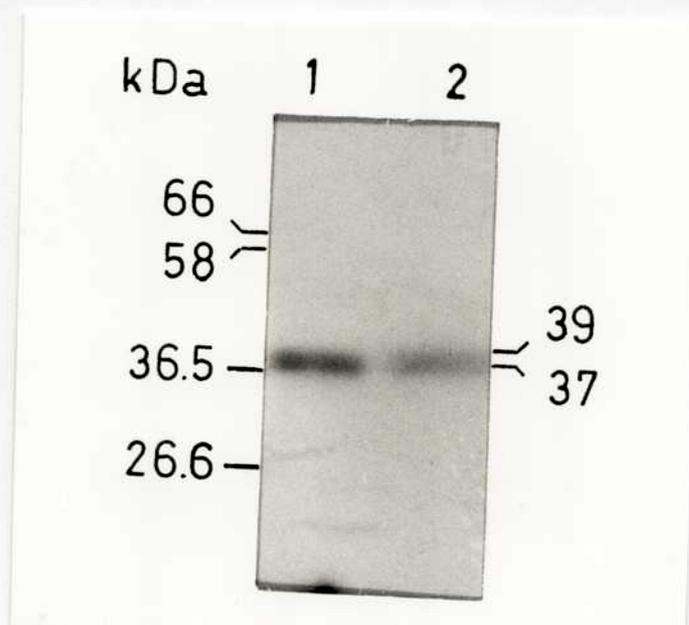
Como se mencionó anteriormente la CK2 es, generalmente, un tetrámero constituido por dos subunidades catalíticas ( $\alpha$ ) y dos subunidades regulatorias ( $\beta$ ). Sin embargo en *S. cerevisiae* (una levadura relacionada con *C. albicans*) se observó que la enzima presentaba dos subunidades  $\beta$  diferentes,  $\beta$  y  $\beta'$ , apartándose de la estructura canónica  $\alpha\alpha'\beta\beta'$ . Se procedió entonces a la identificación de las subunidades partiendo de

la base que la enzima purificada presentaba cuatro polipéptidos de diferentes masas moleculares.

#### 2.2.1.5.1 Identificación de las subunidades catalíticas

##### 2.2.1.5.1.1 Fosforilación *in situ*, geles activos

Con el objetivo de identificar las subunidades catalíticas se aprovechó, justamente, la capacidad de dichas subunidades de fosforilar sustratos, en forma independiente de la presencia de las subunidades  $\beta$ . Alícuotas de los dos últimos pasos de purificación que contenían las mismas unidades totales de actividad de CK2 se sometieron a un ensayo de fosforilación *in situ* como se describe en el punto 9 de materiales y métodos. El autorradiograma resultante puede ver en la **figura R-5**, este revela que dos polipéptidos de 39 y 37 kDa son capaces de fosforilar la caseína polimerizada en el gel.



**Figura R-5** *Detección de las subunidades catalíticas de la CK2*

Alicuotas de los dos últimos pasos de purificación de la CK2 (Q- Sepharosa, carril 1 y heparina-agarosa, carril 2), equivalentes a 0,25 U de enzima se utilizaron para realizar un ensayo de fosforilación in situ (geles activos), tal como se detalla en materiales y métodos. El gel se secó y se autorradiografió. Los estándares preteñidos se señalan en el margen izquierdo de la figura.

Cuando el mismo procedimiento se llevó a cabo en ausencia de caseína en el gel no se observó ninguna banda. Por otro lado la presencia de cantidades semejantes de sustrato fosforilado en dos preparaciones diferentes (comparar calles 1 y 2) sugieren que ambos polipéptidos son subunidades catalíticas de la CK2 de *C. albicans* puesto que si alguno de ellos fuera un contaminante debería estar representado en diferentes cantidades en ambas preparaciones.

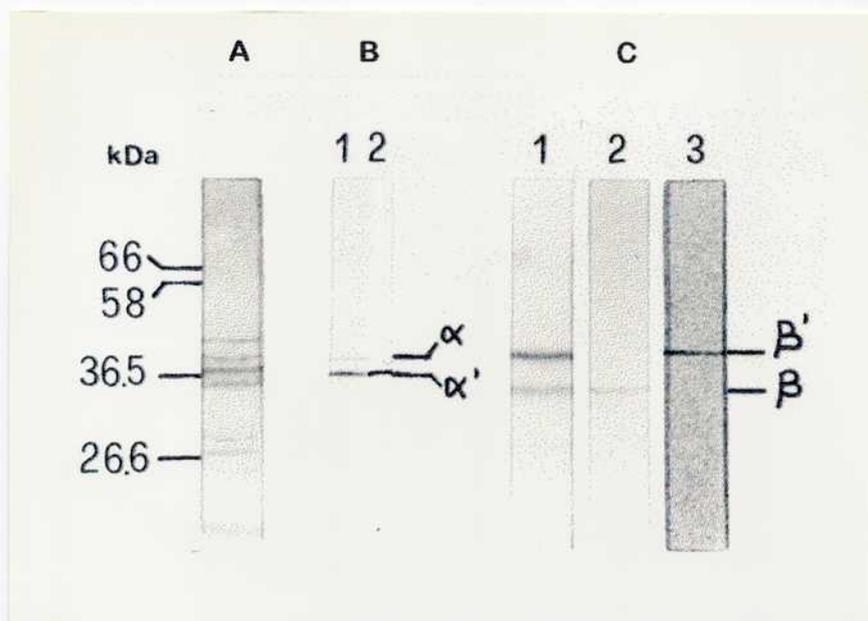
#### 2.2.1.5.1.2 western blot

Para examinar si las proteínas de 37 y 39 kDa eran subunidades diferentes y para establecer posibles homologías estructurales con las subunidades catalíticas de otros organismos, antisueros levantados contra la subunidad  $\alpha$  de *D. melanogaster* y  $\alpha'$  de *S. cerevisiae* se probaron en cuanto a su capacidad para reconocer las subunidades de la CK2 de *C. albicans* mediante inmunoreconocimiento en membranas.

Como puede observarse en la **figura R-6, B**, el anticuerpo levantado contra la subunidad  $\alpha$  de *D. melanogaster* reacciona con ambos polipéptidos, el de 39 y el de 37 kDa. Reportes previos, Padmanabha y Glover, (1987) indican que el mismo antisuero utilizado en este trabajo tenía reactividad cruzada con dos polipéptidos de levadura de 42 y 35 kDa que fueron identificados como las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  respectivamente de la CK2 de *S. cerevisiae*. Por otro lado el antisuero levantado contra la subunidad  $\alpha'$  de la CK2 de la levadura reconoce sólo el polipéptido de 37 kDa de la enzima de *C. albicans*.

La reactividad cruzada de los anticuerpos utilizados indicaría que el polipéptido de 39 kDa presenta homología con la subunidad  $\alpha$  de *D. melanogaster*, mientras que el

polipéptido de 37 kDa de la CK2 de *C. albicans* sería homólogo al de 35 kDa de la enzima de *S. cerevisiae*.



**Figura R-6 Identificación de las subunidades de la CK2 de *C. albicans***

Alicuotas apropiadas de la enzima purificada se analizaron en SDS-PAGE 12 %. Panel A: 10  $\mu$ g de proteína purificada se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R-250. Las masas moleculares de la proteínas marcadoras se señalan en el margen izquierdo. Paneles B y C: 300 ng de la enzima purificada se sometieron a una reacción de autofosforilación como se detalla en materiales y métodos y se dividieron en tres partes iguales, que se sembraron en tres carriles diferentes y se resolvieron en SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y cada uno de estos carriles se incubó con diferentes antisueros. (B) una mitad del carril se incubó con el suero anti subunidad  $\alpha$  de *D. melanogaster* (carril 1) y la otra mitad se incubó con el suero anti subunidad  $\alpha'$  de *S. cerevisiae* (carril 2); ambos antisueros se utilizaron en una dilución 1:100. (C) Un carril se incubó con el suero anti subunidad  $\beta$  de *D. melanogaster* (carril 2) y el otro carril se incubó con suero anti subunidad  $\beta'$  de *S. cerevisiae* (carril 3); ambos antisueros se utilizaron en una dilución 1:50. La calle 1 muestra el autoradiograma de uno de los carriles.

#### 2.2.1.5.2 Identificación de las subunidades regulatorias

De los cuatro polipéptidos identificados como posibles subunidades de la CK2 de *C. albicans*, dos se identificaron como las subunidades catalíticas de la enzima. Los siguientes ensayos fueron realizados para dilucidar la identidad de los dos polipéptidos restantes de 44 y 36 kDa, respectivamente.

##### 2.2.1.5.2.1 Ensayos de autofosforilación

La capacidad de la CK2 de autofosforilarse en sus subunidades regulatorias representa un buen test diagnóstico para evaluar la presencia de subunidades  $\beta$  (Meggio y col., 1983). Por lo tanto para estudiar si los polipéptidos de 36 y 44 kDa eran subunidades regulatorias se realizó un ensayo de autofosforilación. Como se puede observar en la **figura R-6 C**, carril 1, cuando la enzima purificada fue incubada en presencia de [ $\gamma$ P<sup>32</sup>] ATP y en ausencia de sustratos exógenos, tanto el polipéptido de 36 como el de 44 kDa resultaron intensamente fosforilados. La banda fosforilada que se puede observar de 28 kDa puede representar un fragmento proteolítico del polipéptido de 44 kDa debido a que con la conservación de la fracción en la heladera la banda de 44 kDa desaparecía mientras que la de 28 kDa se hacía evidente.

##### 2.2.1.5.2.2 western blot.

Con el objetivo de dilucidar totalmente la estructura en subunidades de la CK2 de *C. albicans* y de establecer homologías estructurales con subunidades regulatorias de otros organismos se realizaron estudios de western blot con anticuerpos heterólogos.

Como puede verse en la **figura 6,C**, carril 2, sólo la banda de 36 kDa es reconocida por un suero levantado contra la subunidad  $\beta$  de *D. melanogaster*. Esta misma banda se reconoce con un suero policlonal levantado contra un péptido C-terminal de la subunidad  $\beta$  humana (resultados no mostrados). En la misma **figura 6, C**, carril 3, se ve que la banda de 44 kDa es reconocida por un antisuero levantado contra la subunidad  $\beta'$

de *S. cerevisiae*, sugiriendo que este polipéptido está inmunológicamente relacionado con la subunidad  $\beta'$  de *S. cerevisiae* y que sería un polipéptido diferente del de 36 kDa.

### 2.2.2 Características bioquímicas

#### 2.2.2.1 Dadores de fosfato

Una de las características más peculiares de la CK2 es su capacidad de utilizar con eficiencia semejante tanto GTP como ATP como dadores de fosfato (Pinna, 1990). Como se puede observar en la **tabla R-III** la enzima purificada de *C. albicans* utiliza tanto ATP como GTP con  $K_m$  de 20  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$  respectivamente, valores estos semejantes a los que se describen para las CK2 aisladas de eucariotas superiores (Hathaway y Traugh, 1982).

#### 2.2.2.2 Sustratos proteicos y peptídicos

Para comparar la capacidad de fosforilar sustratos exógenos de la enzima purificada de *C. albicans* con las descritas para otros organismos, se utilizaron como representantes de los numerosos sustratos identificados para esta enzima los que se consideran más representativos, siendo estos caseína, el péptido específico diseñado por Marin y col., (1994) y la calmodulina.

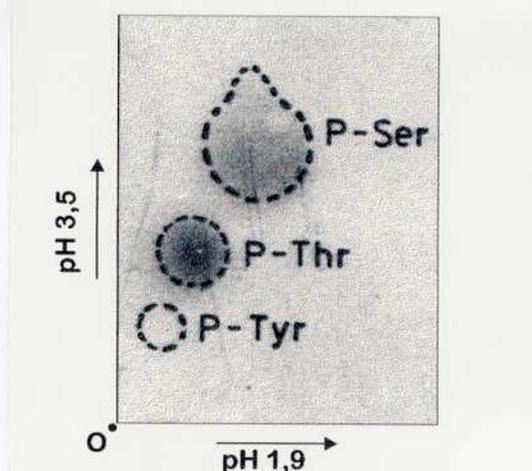
**Tabla R-III Propiedades cinéticas de la CK2 de *C. albicans***

K <sub>m</sub> para el ATP	20 $\mu\text{M}$
K <sub>m</sub> para el GTP	40 $\mu\text{M}$
K <sub>m</sub> para caseína	1,78 mg/ml
V <sub>max</sub> para caseína	398 nmol/min/mg
K <sub>m</sub> par el péptido	21 $\mu\text{M}$
V <sub>max</sub> para el péptido	1250 nmol/min/mg

Los parámetros cinéticos se determinaron variando las cantidades de cada sustrato. La constante aparente de Michaelis ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) se obtuvieron de la representación de los datos según Lineweaver-Burk.

En la **tabla R-III** se pueden observar los valores obtenidos para las  $K_m$  de los diferentes sustratos. La CK2 de *C. albicans* presenta gran afinidad por el sustrato peptídico ( $K_m$  21  $\mu M$ ). La  $V_{max}$  obtenida con el péptido fue tres veces mayor que la obtenida cuando el sustrato utilizado fue caseína. Estos datos son similares a los descritos por Marin y col, (1994) para la enzima de hígado de rata

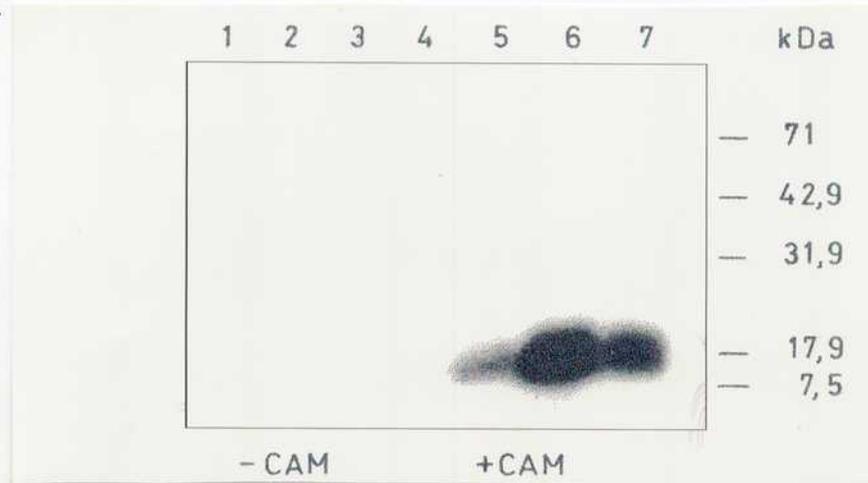
El aminoácido fosforilado en la caseína es uno de los aspectos distintivos entre las quinasas CK1 y CK2. Mientras que la primera sólo fosforila residuos de serina la CK2 es capaz de fosforilar tanto serina como treonina (Pinna, 1990). El análisis del aminoácido fosforilado en la caseína por la CK2 de *C. albicans* se muestra en la **figura R-7**. Como puede observarse se fosforilan tanto residuos de serina como residuos de treonina, como se espera para una típica CK2.



**Figura R-7** Identificación del aminoácido fosforilado.

La caseína se fosforiló en presencia de  $[\gamma P^{32}]ATP$  como se detalla en materiales y métodos por la CK2 purificada de *C. albicans*. Los aminoácidos liberados se resolvieron en electroforesis bidimensional a pH 1,9 en la primera dimensión y a pH 3,5 en la segunda. Sobre el autoradiograma las líneas punteadas indican la posición de estándares de fosfoserina (P-ser), fosfotreonina (P-Thr) y fosfotirosina (P-Tyr), que se revelaron con ninhidrina.

Otra característica general de la CK2 es su capacidad de fosforilar a la calmodulina *in vitro* en forma absolutamente dependiente de polilisina (Meggio y col. 1987). Como puede observarse en la **figura R-8** la CK2 de *C. albicans* es capaz de fosforilar la calmodulina en presencia de 0,2  $\mu\text{M}$  polilisina. Por otro lado se obtuvo la  $K_m$  para la calmodulina para la enzima de *C. albicans* y la CK2 de hígado de rata, en presencia de 0,2  $\mu\text{M}$  polilisina. Para ambas enzimas se obtuvieron valores similares de 10  $\mu\text{M}$  y 13  $\mu\text{M}$  respectivamente.

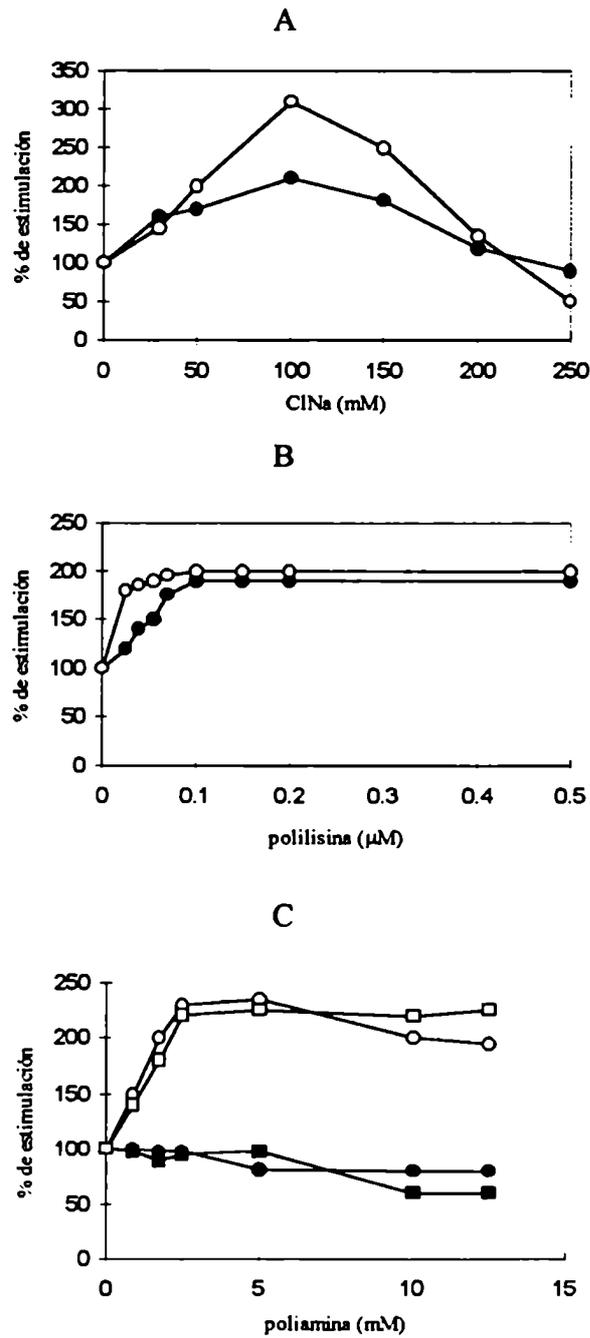


**Figura R-8 Fosforilación de la calmodulina**

Se estudió la capacidad de la CK2 de *C. albicans* para fosforilar calmodulina. las reacciones contenían, en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ : Tris ClH pH 7,4 50 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM,  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  10 mM, ClNa 100 mM,  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP 50  $\mu\text{M}$  (1000 cpm/pmol). Las incubaciones se llevaron a cabo durante 10 min a 30  $^\circ\text{C}$ . Los carriles 5, 6 y 7 llevan 0,85  $\mu\text{g/ml}$  de calmodulina; los carriles 2 y 5 contienen 0,2  $\mu\text{M}$  polilisina; y los carriles 2, 6 y 7 contienen 2  $\mu\text{M}$  polilisina. En el carril 7 se agregó 1,25  $\mu\text{g/ml}$  de heparina. En el margen derecho de la figura se indica la posición de los marcadores de peso molecular.

### 2.2.2.3 Efecto del ClNa , compuestos policatiónicos y heparina sobre la actividad CK2

Como ya ha sido demostrado para otras CK2 el ClNa produce un marcado incremento en la actividad quinasa de la enzima.



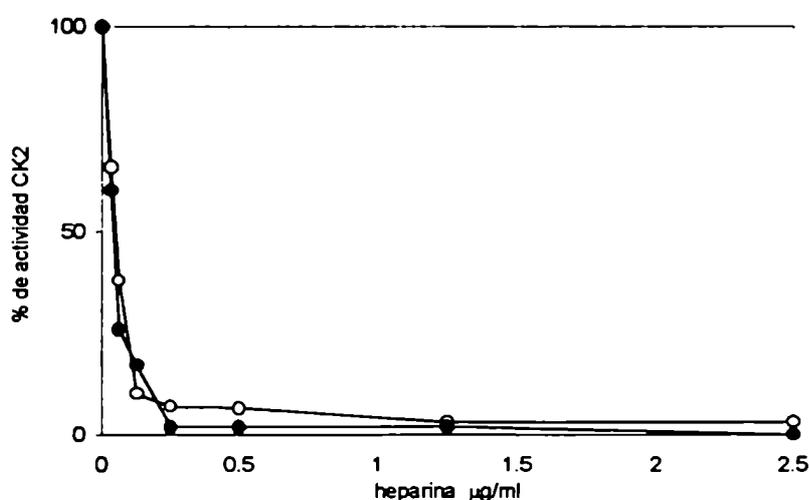
**Figura R-9 Efecto del CINa y compuestos policatiónicos sobre la actividad CK2**

La actividad de CK2 (7,5 miliunidades) se ensayó utilizando como sustrato caseína (símbolos abiertos) o péptido (símbolos cerrados), en presencia de concentraciones crecientes de CINa (A), polilisina (B), espermina (círculos) o espermidina (cuadrados)(C). la actividad se expresa como porcentaje, tomando como 100 % la actividad sin agregados.

Tal como se observa en la **figura R-9 A**, la CK2 de *C. albicans* ve estimulada su actividad, independientemente de cual sea el sustrato utilizado, péptido o caseína, en presencia de ClNa; alcanzándose la mayor actividad, tres veces la basal, en presencia de 100 mM ClNa.

También se investigó el efecto de varios policationes sobre la actividad de CK2 (**figura R-9, B y C**). Una estimulación máxima de dos veces se observa en presencia de 5 mM espermina, 10 mM espermidina o 0,1  $\mu$ M polilisina cuando se utilizó caseína como sustrato fosforilable. La espermina y la espermidina no logran estimular la actividad de CK2 cuando el sustrato utilizado en el ensayo es el péptido, mientras que el efecto de la polilisina se ve independientemente al sustrato utilizado. La polilisina afecta la  $V_{max}$  pero no la  $K_m$  tanto para caseína como para el péptido (resultado no mostrado). Como ha sido descrito para otras CK2 el efecto de los estimuladores depende de la calidad del sustrato utilizado (Pinna, 1990). Como ya se ha mencionado antes, el ejemplo más extremo es la calmodulina donde la presencia de polilisina es un requisito indispensable para que la fosforilación por CK2 tenga lugar.

Un criterio diagnóstico de una actividad de CK2 es la extrema sensibilidad de la enzima a la presencia de heparina en muy bajas concentraciones ( $<1 \mu\text{g/ml}$ ).



**Figura R-11 Inhibición por heparina**

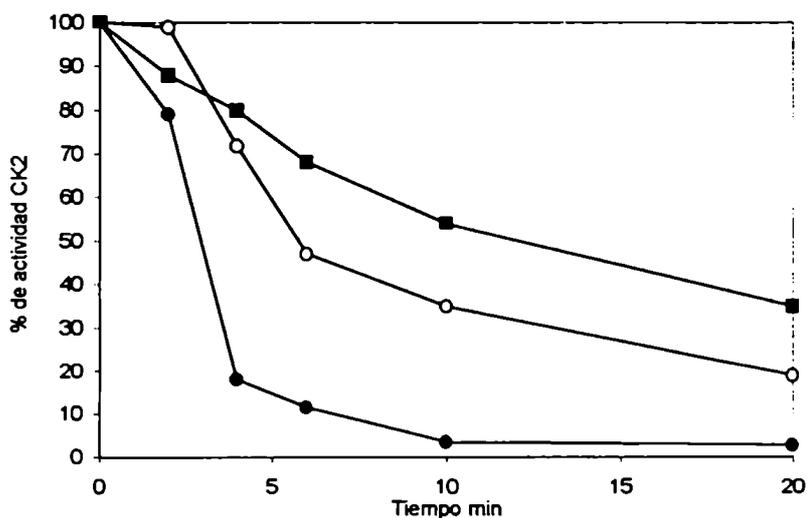
Alicuotas de CK2 purificada (10 miliunidades) se ensayaron utilizando como sustrato el péptido específico 70  $\mu\text{M}$  (○) o caseína 5 mg/ml (●) en presencia de concentraciones crecientes de heparina.

Los ensayos se llevaron a cabo como se detalla en materiales y métodos. Los resultados están expresados como el porcentaje de actividad quinasa, siendo el 100 % en ausencia de heparina.

Como se puede observar en la **figura R-10**, la enzima purificada se inhibe casi totalmente en presencia de 0,2  $\mu\text{g/ml}$  de heparina, mientras que se obtiene una inhibición del 50 % en presencia de 0,07  $\mu\text{g/ml}$ , independientemente del sustrato utilizado.

### 2.3 Inactivación térmica de la CK2

Se estudió la estabilidad térmica de la enzima. Como se puede ver en la **figura R-11** la enzima de *C. albicans* presenta una inactivación del 50 % con solo 3 min. de preincubación a 45 °C. Un comportamiento similar fue descrito para la enzima de *S. cerevisiae* (Meggio y col., 1986) que presentara una estructura de subunidades semejante a la enzima de *C. albicans*.



**Figura 12 Inactivación térmica**

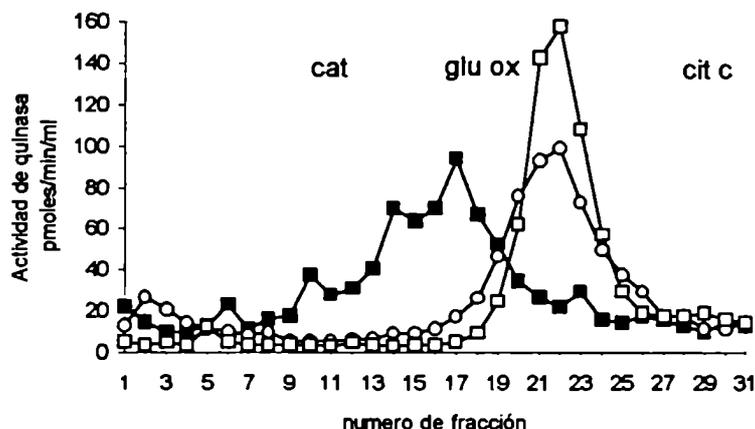
Para estudiar la inactivación térmica de la CK2 0.2 U de la enzima de *C. albicans* (●), 0.2 U de la enzima de hígado de rata (■) y 0.2 U de la subunidad  $\alpha$  humana recombinante (○) se preincubaron a 45 °C en presencia de 0,1 mg/ml de BSA durante 0, 2, 4, 6, 10 y 20 min. Luego de las preincubaciones las muestras se pusieron en hielo y la actividad remanente se midió con el

agregado de [ $^{32}\text{P}$ ] ATP y caseína. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 10 min a 37 °C. La actividad de quinasa se refiere como porcentaje siendo el 100 % la actividad inicial.

Comparativamente se realizó la curva de inactivación térmica de la enzima de hígado de rata y de la subunidad  $\alpha$  humana recombinante, obteniéndose un 50 % de inactivación de 15 y 6 min respectivamente. Lo inesperado de estos resultados fue el comportamiento a la inactivación térmica presentado por la subunidad  $\alpha$  sola ya que ésta parece ser más estable que las enzimas que presentan una estructura  $\beta$ - $\beta'$ .

#### 2.4 Estudio de los estados de agregación de la enzima de *C. albicans* utilizando gradientes de sacarosa

Una propiedad bien conocida de la CK2 es su tendencia a autoagregarse en condiciones de baja fuerza iónica, este es un proceso ordenado y reversible que da como productos polímeros filamentosos de la enzima. Para estudiar la estructura adoptada por la CK2 de *C. albicans* en distintas condiciones se utilizaron gradientes de sacarosa con diferentes agregados. Como se puede observar en la **figura R-12** la enzima de *C. albicans* presenta una distribución dispersa cuando el gradiente se realiza en presencia de 0,1 M ClNa pero si la fuerza iónica se aumenta a 0,4 M ClNa la enzima presenta un único pico con un s de 6 que corresponde al monómero de la enzima ( $\alpha\alpha'\beta\beta'$ ). En condiciones de baja fuerza iónica con el agregado de 0,02 M  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  la enzima de *C. albicans* vuelve a presentar un s de 6. La estructura tipo anillo descrita para la enzima de *D. melanogaster* por Valero y col. (1995) bajo estas condiciones no se observó en la enzima de *C. albicans*. Se sabe que las interacciones para formar la estructura cuaternaria tipo anillo involucran uniones entre las subunidades  $\beta$  de las distintas holoenzimas, mientras que los tetrámeros son capaces de formar esta estructura, las subunidades catalíticas solas no logran asociarse entre ellas. La composición en subunidades de la CK2 de *C. albicans* un tanto diferente a la de *D. melanogaster* podría ser una de las explicaciones.



**Figura R-12 Estados de agregación de la enzima de *C. albicans***

Para analizar la distribución de la CK2 en diferentes condiciones se utilizaron gradientes de sacarosa realizados en presencia de 0,1 M ClNa (■), en presencia de 0,4 M ClNa (□) o en presencia de 0,1 M ClNa + 20 mM Cl<sub>2</sub>Mg (○). Alícuotas de cada fracción se ensayaron para la actividad quinasas y para las proteínas marcadoras. La actividad de la CK2 esta expresada como pmoles/min/ml. Los marcadores utilizados fueron catalasa (11,3 S), glucosa oxidasa ( 8,3 S) y citocromo c (1,7 S).

## 2.5 Integración

De acuerdo a los estudios presentados en esta sección la CK2 purificada a aparente homogeneidad de células levaduriformes de *C. albicans* presenta una forma heterotetramérica con un peso molecular aparente de 159 kDa en su forma nativa.

En base a los experimentos de autofosforilación, fosforilación *in situ* y los ensayos de reconocimiento inmunológico, podemos inferir que la CK2 de *C. albicans* presenta una estructura heterotetramérica del tipo  $\alpha\alpha'\beta\beta'$ , con dos subunidades catalíticas diferentes,  $\alpha$  y  $\alpha'$ , de 39 y 37 kDa respectivamente, y dos subunidades regulatorias,  $\beta$  y  $\beta'$ , con pesos moleculares aparentes inusualmente altos de 36 y 44 kDa respectivamente. La subunidad  $\beta$  de 36 kDa presenta homología con la subunidad  $\beta$  de *D. melanogaster*, tal como lo

demuestra la reactividad inmunológica cruzada. La capacidad de autofosforilarse y la reactividad cruzada entre el polipéptido de 44 kDa y el suero levantado contra la subunidad  $\beta'$  de *S. cerevisiae* avalan la identificación de este polipéptido como una subunidad  $\beta'$  de la enzima. Cabe indicar que tal como ocurre con las subunidades regulatorias de la CK2 de *S. cerevisiae*, las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  presentan un peso molecular aparente mayor que el promedio de las subunidades regulatorias descritas hasta el momento; siendo para *C. albicans* la subunidad de mayor peso molecular la  $\beta'$ .

Como se ha demostrado en este capítulo, la enzima purificada de *C. albicans* comparte la mayoría de las características distintivas de las CK2 de diferentes organismos.

Así la enzima de *C. albicans* es capaz de fosforilar el péptido específico RRRADDSDDDDD, que no es fosforilado por la quinasa de proteínas CK1 (Marin y col., 1994), y fosforila la caseína en residuos de serina y treonina. La calmodulina, que en general, es un buen sustrato de la CK2, es fosforilada por la enzima de *C. albicans* cumpliendo con el requerimiento absoluto de polilisina tal como lo hacen las CK2 descritas hasta el momento (Meggio y col., 1987).

La  $K_m$  obtenida para el GTP es comparable con la obtenida para el ATP (40  $\mu\text{M}$  vs 20  $\mu\text{M}$ ), indicando que la enzima de *C. albicans* utiliza con similar eficiencia cualquiera de estos dos nucleótidos, siendo ésta una propiedad distintiva de la CK2.

Otra similitud es la extrema sensibilidad a la inhibición por heparina, (IC 50% en presencia de 0,07  $\mu\text{g/ml}$  de heparina); y la capacidad de ver estimulada su actividad por compuestos policatiónicos tales como polilisina, espermina y espermidina.

En cuanto a la curva de inactivación térmica la enzima purificada de *C. albicans* presenta un comportamiento similar a la CK2 de *S. cerevisiae* (Meggio y col., 1986), perdiendo un 50 % de la actividad inicial en solo 3 min. de incubación a 45 °C. Sorprendentemente la subunidad  $\alpha$  aislada presentó una mayor estabilidad a la temperatura. Dado que una de las características de las subunidades  $\beta$  es conferir estabilidad a las subunidades catalíticas, cabe pensar que la presencia de dos subunidades

regulatorias diferentes en las enzimas de *C. albicans* y *S. cerevisiae* podría ser responsable de este comportamiento.

### **3. Fosforilación del proteasoma 20S de *C. albicans***

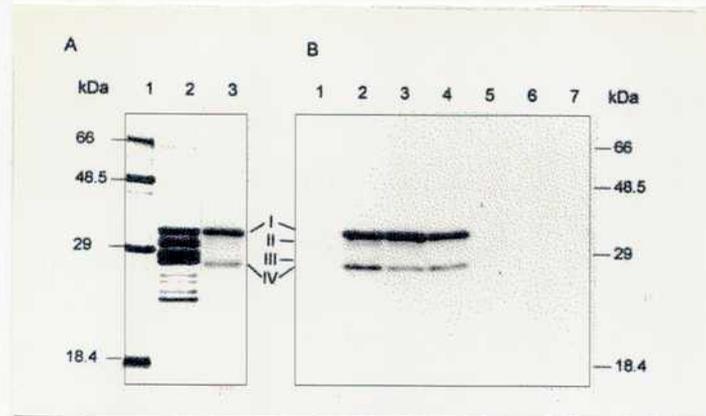
La identificación y caracterización de sustratos de la CK2 provee una herramienta importante para definir el rol de esta quinasa *in vivo*. Como se mencionó en la introducción reportes recientes indican que la subunidad C8 del proteasoma 20S de mamíferos es eficientemente fosforilada *in vivo* e *in vitro* por la CK2 (Castaño y col., 1996). En nuestro laboratorio hemos demostrado que el proteasoma 20S de *S. cerevisiae* es fosforilado por la CK2 recombinante humana (rCK2 humana) en presencia de polilisina, mayormente en la subunidad  $\alpha 7/C8$  (Pardo y col., 1998).

Teniendo en cuenta estos hallazgos, en colaboración con los Drs. P. Pardo y P. Fernández Murray, y la Lic. Lorena Franco, se estudió la fosforilación del proteasoma 20S de *C. albicans* por la CK2 homóloga.

El proteasoma 20S de *C. albicans* se purificó siguiendo el protocolo descrito por Fernández Murray y col., (manuscrito en publicación).

Para estudiar la capacidad del proteasoma 20S de ser sustrato de la CK2, se analizó la fosforilación *in vitro* del mismo utilizando CK2 homóloga purificada, en las condiciones descritas en materiales y métodos. Como se puede ver en la **figura R-13, A**, en presencia de 1  $\mu$ M polilisina, se ven dos bandas mayoritariamente fosforiladas de 32 y 27 kDa respectivamente (calle 3, bandas I y IV). Cuando la relación polilisina/proteasoma se aumenta dos bandas más se hacen visibles (figura R-13 B, calle 2) de 31 y 28 kDa (bandas II y III respectivamente). En las calles 6 y 7 se ven los resultados de los controles en presencia de polilisina, no se observa autofosforilación de las subunidades catalíticas de la CK2 en ausencia de proteasoma (calle 6), y no se observa fosforilación del proteasoma en ausencia de CK2 (calle 7), indicando que el proteasoma purificado está libre de actividad quinasa endógena. La fosforilación se ve inhibida por completo en presencia de 2,5  $\mu$ g/ml de heparina (calle 5). Ni la espermina ni la espermidina fueron capaces de

reemplazar a la polilisina en su efecto sobre la fosforilación del proteasoma (resultados no mostrados).



**Figura R-13 Fosforilación del proteasoma 20S de *C. albicans* por la CK2 homóloga**

(A) Proteasoma purificado (1,3 µg) se fosforiló con la CK2 homóloga en presencia de 1 µM polilisina. La calle 1 muestra la posición de los marcadores de peso molecular; la calle 2 el perfil de bandas del proteasoma purificado teñidas con plata; y la calle 3 muestra el autorradiograma del gel. (B) Proteasoma purificado (270 ng) se fosforiló con la CK2 purificada de *C. albicans* en ausencia (calle 1) o en presencia de 2 µM polilisina (calle 2); o con 0,2 µM polilisina (calles 3-5) más 1,25 µg/ml de heparina (calle 4) o con 2,5 µg/ml de heparina (calle 5). La calle 6 muestra la CK2 sin proteasoma y la calle 7 muestra el proteasoma 20S sin CK2, ambos en presencia de 2 µM polilisina. Las masas moleculares de los marcadores se indican a la derecha. I, II, III, IV, designan las posiciones de las subunidades fosforiladas del proteasoma.

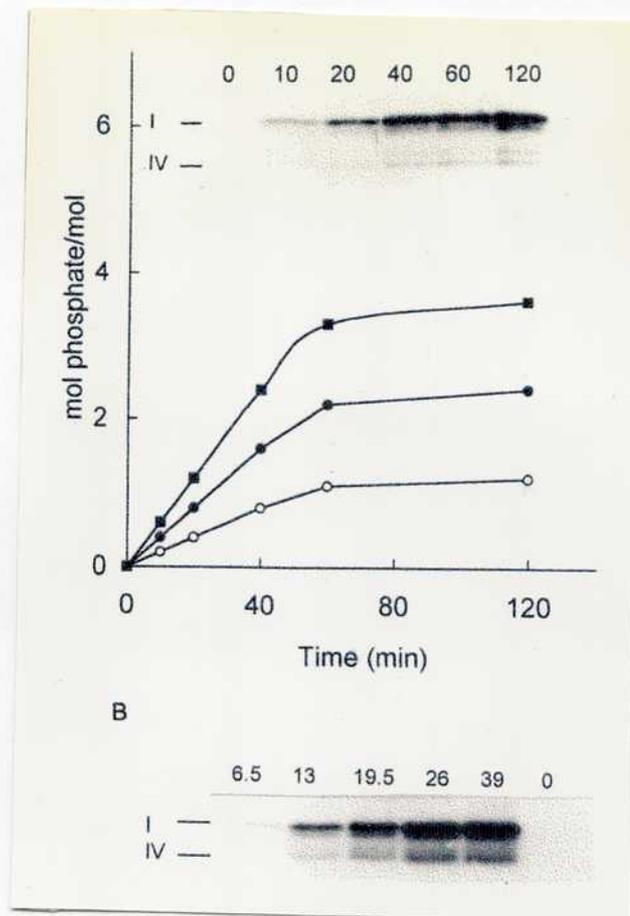
Para determinar la tasa y la estequiometría de la incorporación de fosfatos, se realizó un ensayo de fosforilación a lo largo del tiempo. Las muestras se analizaron por SDS/PAGE y la radioactividad incorporada a las dos bandas mayoritariamente fosforiladas (I y IV) se determinó como se detalla en el punto 12 de materiales y métodos. Los

resultados que se pueden observar en la **figura R-14, A** indican que la máxima incorporación, que se da a las dos horas de incubación, es de 2,6 moles de P/mol de proteasoma para la banda I y 1,3 moles de P/mol de proteasoma para la banda IV. La suma de estos dos valores da 4 moles de P totales/mol de proteasoma. Cuando la radioactividad incorporada se calculó en base a la cantidad de  $P^{32}$  retenido en papeles de fosfocelulosa, los valores oscilaron entre 4,5 y 6 moles de P/mol de proteasoma, estas diferencias podrían ser atribuidas a la variabilidad en la incorporación de  $P^{32}$  en las bandas II y III.

La incorporación de  $P^{32}$  en función a la concentración de proteasoma se muestra en la **figura R-14, B**, obteniéndose una  $K_m$  de 11-14 nM, indicando una gran afinidad de la CK2 por el proteasoma.

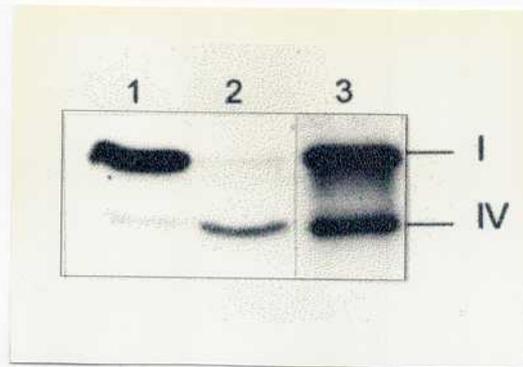
### 3.1 Fosforilación del proteasoma 20S por la subunidad $\alpha$ recombinante humana de la CK2

La fosforilación totalmente dependiente de polilisina del proteasoma 20S es comparable a la fosforilación de unos pocos sustratos de la CK2, siendo el más estudiado la calmodulina (Meggio y col., 1987, 1992, 1994; Bidwai y col., 1993; Marin y col., 1997). Como se ha mencionado anteriormente la calmodulina no se fosforila por CK2 a menos que se agregue polilisina en el ensayo. Sin embargo, la subunidad  $\alpha$  recombinante fosforila espontáneamente a la calmodulina, y esta fosforilación se ve inhibida en presencia de polilisina (Meggio y col., 1992). Se estudió la capacidad de fosforilar al proteasoma 20S de la subunidad  $\alpha$  recombinante en presencia o en ausencia de polilisina. Como se puede observar en la figura R-15, en ausencia de polilisina la subunidad  $\alpha$  fosforila mayormente a la banda I y en menor medida a la banda IV (calle 1). La adición de polilisina en el ensayo tiene un efecto inhibitorio de la fosforilación de la banda I mientras que la fosforilación de la banda IV se ve estimulada (calle 2).



**Figura R-14 Fosforilación del proteasoma 20S en función del tiempo (A) o de la concentración de proteasoma (B).**

Los ensayos de fosforilación se llevaron a cabo esencialmente como se detalla en materiales y métodos. Las muestras se separaron en SDS/PAGE 15 % y las bandas radioactivas se localizaron por autorradiografía. (A) Las bandas radioactivas se cortaron del gel seco y la radioactividad se contó con mezcla centelladora en el contador de centelleo. Las curvas representan la estequiometría para al banda I (●) banda IV (○) y la suma de ambas (■). Los gráficos insertados muestran las regiones correspondientes de los autorradiogramas. El tiempo de incubación, en minutos, está indicado sobre cada calle. (B) Las muestras se incubaron por 30 min. El autorradiograma muestra la región correspondiente del gel, la concentración de proteasoma (nM) se indica sobre cada calle. Cada calle del autorradiograma se cuantificó por escaneo de densitometría utilizando un Analizador de Imágenes y el programa Gel Data Base. Los valores se tomaron como unidades de velocidad arbitrarias. La  $K_m$  para el proteasoma se estimó utilizando el plot de Lineweaver-Burk.



**Figura R-15 Fosforilación del proteasoma 20S por la subunidad  $\alpha$  recombinante humana (*rhCK2- $\alpha$* )**

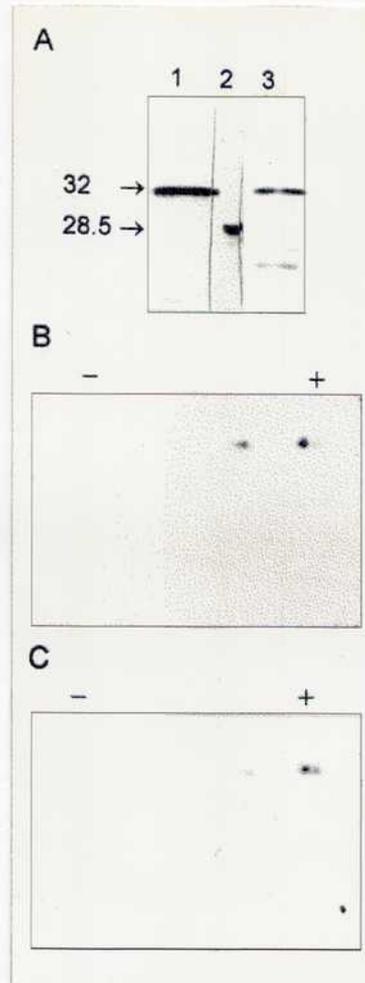
Proteasoma (270 ng) se fosforilaron con 10 milliunidades de *rhCK2- $\alpha$*  (calles 1 y 2) o 4 milliunidades de CK2 purificada de *C. albicans* (calle 3), en ausencia (calle 1) o en presencia de 1  $\mu$ M polilisina (calles 2 y 3) bajo las condiciones que se detallan en el punto 12 de materiales y métodos. Las muestras se incubaron por 2 hrs, se separaron por SDS/PAGE 15 %, y las bandas radioactivas se visualizaron por autorradiografía.

### 3.2 Identificación de la banda mayoritariamente fosforilada del proteasoma 20S

Teniendo en cuenta que la subunidad del proteasoma 20S mayoritariamente fosforilada en mamíferos (Castaño y col. 1996) y en *S. cerevisiae* (Pardo y col. 1998) es el componente C8/ $\alpha$ 7, se intentó la identificación de la banda mayoritariamente fosforilada mediante la técnica de western blot utilizando el anticuerpo monoclonal MCP72 anti subunidad C8 del proteasoma humano (Kristensen y col., 1994). La **figura R-16, A** muestra el resultado del inmunoreconocimiento en membranas del proteasoma 20S de *C. albicans* previamente fosforilado por la CK2 homóloga. Como se puede observar la banda mayoritariamente fosforilada de 32 kDa (calle 3) se reconoció con el anticuerpo (calle 1). La calle 2 muestra el inmunoreconocimiento de la subunidad de 28,5 kDa C8 del proteasoma humano.

El mismo análisis se realizó con el proteasoma fosforilado separado en NEPHGE-SDS/PAGE y los resultados se observan en la **figura R-16, B y C**. El proteasoma se fosforiló con la subunidad  $\alpha$  para evitar la interferencia de la polilisina con los anfólitos.

Como puede observarse el polipéptido que presenta reactividad cruzada con el suero anti C8 se resuelve en tres formas diferentes, sugiriendo la existencia de más de un sitio fosforilable.



**Figura R-16** Identificación de la banda mayoritariamente fosforilada por western blot en geles mono y bidimensional.

(A) 3  $\mu\text{g}$  de proteasoma fosforilado de *C. albicans* (calle 1) y 2  $\mu\text{g}$  de proteasoma de hígado de rata (calle 2) se separaron en SDS/PAGE 15 %, se transfirieron a membranas de PVDF y se revelaron con suero anti-C8 (calles 1 y 2 respectivamente). El carril 3 muestra la autoradiografía del gel. (B y C) 5  $\mu\text{g}$  de proteasoma de *C. albicans* se fosforilaron con rhCK2- $\alpha$ , se resolvió en NEPHGE-SDS/PAGE, se transfirió a membrana de PVDF y se reveló con un suero anti-C8; (C) muestra el inmunoreconocimiento, (D) la autorradiografía de la membrana.

Para identificar la banda mayoritariamente fosforilada por otro método se obtuvo la secuencia de un fragmento triptico de la misma. La **figura R-17** muestra que la secuencia muestra un alto grado de homología con la región correspondiente de la subunidad  $\alpha 7$  de *S. cerevisiae*.

<i>S. cerevisiae</i> $\alpha 7$	84	<b>DGrHlvNRgR</b>	EEAa <b>SFKkLY</b>	KTpi <b>PI</b> pafa	<b>DRLgqYVQaH</b>	123	
<i>C. albicans</i> $\alpha 7$	1	<b>DGlHfeNRcR</b>	DESq <b>SFKsIF</b>	KTmt <b>PI</b> fnlm	<b>DRLvlHVQnY</b>	40	
<i>S. c</i> $\alpha 7$	124	<b>TLYNSvRPFg</b>	Vs <b>TIfGGVD-</b>	KNGA-HLYML	e <b>PSGSYWGy</b> k	Ga <b>ATgKgRQs</b>	171
<i>C. a</i> $\alpha 7$	41	<b>TcHNScRPFg</b>	Iv <b>SIiGGLDn</b>	EDGAp <b>LYMI</b>	a <b>PSGSYWGy</b> n	Gp <b>ATdKvRQi</b>	90
<i>S. c</i> $\alpha 7$	172	a <b>KAELEKLvd</b>	hhp <b>EgLSare</b>	<b>AVkqAAKIIY</b>	La <b>HEDNKEKD</b>	<b>FELEISWCSl</b>	221
<i>C. a</i> $\alpha 7$	91	p <b>KSELEKLty</b>	--- <b>EeLTcle</b>	AIhh <b>AARIIH</b>	Li <b>HEDNKDKD</b>	<b>YELEISWCSk</b>	137
<i>S. c</i> $\alpha 7$	222	se <b>TnGlHKFV</b>	kg <b>DLLQEaid</b>	f <b>AQKEingDD</b>	DEDEDDsDnv	mSs <b>DDEnAPv</b>	271
<i>C. a</i> $\alpha 7$	138	eh <b>TgGkHQFI</b>	sd <b>DLLEQvrk</b>	l <b>AEEE---EE</b>	EEDDDEeEea	gAd <b>DEEmAP</b>	183
			<b>HQFI SxDLLEQA</b>				
<i>S. c</i> $\alpha 7$	272	atnanattdq	egdihle				288

**Figura R-18 Alineamiento de la secuencia parcial de la subunidad  $\alpha 7$  de *C. albicans* con la región correspondiente de su homóloga en *S. cerevisiae***

La secuencia aminoacídica de la subunidad  $\alpha 7$  de *C. albicans* se dedujo de la secuencia parcial del gen recientemente obtenida (N. Federspiel, comunicación personal). Esta secuencia se alineó con la ya conocida de la subunidad  $\alpha 7$  de *S. cerevisiae* (YC1, Fujiwara y col., 1990). Los guiones significan los gaps introducidos para mantener el alineamiento. Los aminoácidos idénticos se señalan con letras mayúsculas negritas, los residuos conservados en mayúsculas. La secuencia subrayada es la que se obtuvo por secuenciación de un fragmento triptico de la subunidad  $\alpha 7$  de *C. albicans*, la X corresponde a un aminoácido desconocido. Los residuos subrayados con doble raya señalan los sitios putativos de fosforilación por CK2

Por otro lado, se realizó el análisis del aminoácido fosforilado en la subunidad  $\alpha 7$  del proteasoma 20S de *C. albicans* obteniéndose residuos de serina y residuos de treonina fosforilados (resultados no mostrados). Esto indica, en coincidencia con los estudios de estequiometría, e inmunoreconocimiento en membranas, la existencia de más de un sitio de

fosforilación. Las serinas y las treoninas que se indican con doble raya en la figura R-18 son posibles sitios de fosforilación por CK2.

### 3.3 Integración

El proteasoma 20S de *C. albicans* se fosforiló eficientemente por la CK2 homóloga en al menos 4 subunidades. La gran afinidad de la CK2 por la partícula 20S se observa por el bajo valor obtenido para la  $K_m$ , en el orden nM. Esto sugiere que el proteasoma es un excelente sustrato de la CK2 al menos *in vitro*.

Análisis de wester blot utilizando un anticuerpo monoclonal levantado contra la subunidad C8 del proteasoma humano permitió la identificación de la banda mayormente fosforilada. La secuencia del fragmento tríptico confirmó la identidad de dicha banda con la subunidad  $\alpha 7$  de *C. albicans*, ya que el fragmento presenta completa homología con dicho gen a excepción de una sustitución (A/V) que podría deberse a una variabilidad alélica.

La existencia de más de un sitio de fosforilación dentro de la subunidad  $\alpha 7$  se ve sugerida por los siguientes resultados: i) la estequiometría de la fosforilación, ii) el inmunoreconocimiento de tres formas en el gel de dos dimensiones, iii) la detección de fosfotreonina y fosfoserina en la subunidad  $\alpha 7$ .

La fosforilación del proteasoma de *C. albicans* por la CK2 homóloga mostró un requerimiento absoluto de polilisina, este resultado se obtuvo también con la holoenzima recombinante humana (resultados no mostrados). Recientemente hemos demostrado (Pardo y col., 1998) que el proteasoma de *S. cerevisiae* presenta el mismo comportamiento; diferenciándose así del proteasoma de mamíferos que es fosforilado en condiciones basales (Ludermann y col., 1993; Castaño y col., 1996).

Nuestros resultados sumados a los de Castaño y col. (1996), sobre la fosforilación de las subunidades C8 y C9 del proteasoma de mamíferos, y los de Umeda y col. (1997) que reportan la fosforilación de la subunidad C2 del proteasoma de arroz, parecerían indicar que la fosforilación de las subunidades del tipo  $\alpha$  del proteasoma 20S es un mecanismo generalizado.

#### 4. Clonado de las subunidades $\beta$ de la CK2 de *C. albicans*

Como se ha descrito en la sección 2 de este trabajo, la composición en subunidades de la CK2 de *C. albicans* parece ser  $\alpha\alpha'\beta\beta'$ . Esta composición de subunidades se ha descrito, hasta el momento, sólo en la levadura *S. cerevisiae* por Padmanabha y Glover, (1987), quienes demostraron mediante técnicas bioquímicas la existencia de una subunidad  $\beta$  de 41-38 kDa y una subunidad  $\beta'$  de 32 kDa formando parte de la holoenzima purificada. Posteriormente se clonaron los genes que codifican para ambas subunidades (ver tabla R-IV).

Otro antecedente del fenómeno de la presencia de dos genes que codifican para dos subunidades regulatorias de la CK2 se obtuvo en 1994, cuando Collinge y Walker describieron en *A. thaliana* la presencia de dos genes relacionados que codifican para las subunidades regulatorias de la CK2, (CKB1 y CKB2); ver tabla R-IV. Por otro lado en *D. melanogaster*, el producto del gen *Stellate*, da un producto relacionado con las subunidades  $\beta$ .

**Tabla R-IV Organismos que presentan heterogeneidad en las subunidades  $\beta$  de la CK2**

Organismo	subunidad	gen que la codifica	Masa molecular (kDa)	
			SDS	teórico
<i>S. cerevisiae</i> <sup>a</sup>	$\beta$	ScCKB1	38/41	32,4
<i>S. cerevisiae</i> <sup>b</sup>	$\beta'$	ScCKB2	32	29,9
<i>A. thaliana</i> <sup>c</sup>	-	AtCKB1		32,4
<i>A. thaliana</i> <sup>c</sup>		AtCKB2		31,9

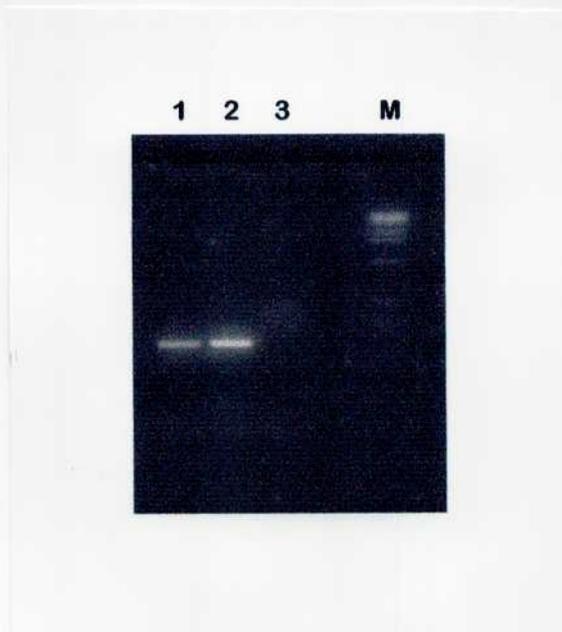
Nota: el producto del gen *Stellate* de *D. melanogaster* no se incluyó en la tabla por ser un caso particular, ya que en principio no se lo aisla formando parte de la holoenzima. <sup>a</sup> Bidwai y col. (1995); <sup>b</sup> Reed y col., (1994); <sup>c</sup> Collinge y Walker (1994)

Dado el importante rol regulatorio de las subunidades  $\beta$ , y los escasos antecedentes en cuanto a una heterogeneidad en la composición de éstas subunidades de la CK2,



Aprovechando esta información se diseñaron dos primers degenerados que flanquean una secuencia de un tamaño constante para todos los genes de la subunidades  $\beta$  conocidos hasta el momento ver **figura R-18** (para mayor detalle ver el punto 4 de materiales y métodos).

Para la reacción de amplificación se utilizó como molde ADN genómico de *C. albicans* y los primers P1 y P2. Como control positivo se utilizó ADN genómico de *S. cerevisiae*. Tanto para *C. albicans* como para *S. cerevisiae* se logró la amplificación de un fragmento único del tamaño esperado, 249 pb, **figura R-19, carriles 1 y 2**.



**Figura R-19 Amplificación de un fragmento de 249 pb utilizando primers degenerados y ADN genómico de *C. albicans* y de *S. cerevisiae* como molde**

ADN genómico aislado de *S. cerevisiae* (calle 1) o de *C. albicans* (calle 2), se utilizó como templado en una reacción de amplificación utilizando los primers P1 y P2, como se detalla en materiales y métodos. En la calle 3 se realizó el control sin ADN molde, y en la calle M se pueden observar los marcadores de peso molecular. El producto de ambas reacciones fue sólo un fragmento de 249 pb que se señala con una flecha.

La premisa utilizada fue que como el tamaño de la región comprendida entre P1 y P2 estaba conservado en todas las subunidades  $\beta$  conocidas, lo mismo debería pasar en *C.*

*albicans*, se puede suponer entonces que el fragmento amplificado a partir del ADN genómico de *C. albicans*, podría ser una mezcla de al menos dos fragmentos diferentes, pertenecientes a cada uno de los genes de las subunidades regulatorias.

La mezcla de amplificación se subclonó en el vector pGEM-T y se obtuvieron mini preparaciones de plásmidos (ver punto 17 de materiales y métodos). Cinco de los clones que dieron positivos se enviaron a secuenciar. El resultado se puede observar en la **figura R-20**

```
TTGTATGGTTTGATACATGCCAGATACATAGTCTCCAAACAAGGTCTAACTGCCATGGCATCC  
AAGTTTGAGAGAAACGACTTTGGCTCTTGTCCTCAAGATATTTTTGTGACGGTATGCATTTAATTCC  
TGTTGGGTGCGACTGATGTGCCGGGACAAGAAACGGTGAGATTGTTTTGTCCTTGCTGTAATGAT  
ATCTATATACCTTCCAGTTCGAGGTATTTGAATATTGACGGTGCCFACTTTGGGACT
```

**Figura R-20: Secuencia del fragmento amplificado**

Una mezcla de PCR cuyo ADN molde fue ADN genómico de *C. albicans* se ligó al vector pGEM-T de PROMEGA según las instrucciones de los fabricantes y se transformaron células competentes. Numerosos clones que llevaban el inserto fueron aislados y se tomaron al azar cinco de los mismos para secuenciarlos. La figura muestra la secuencia obtenida de los cinco fragmentos, que resultaron ser idénticos entre si. En la figura se señala en rojo el primer P1 y en verde el primer P2.

La secuencia de los cinco clones tomados al azar fue la misma, esto indicaría que de existir dos genes en el genoma de *C. albicans* sólo uno de ellos ha sido amplificado por PCR en las condiciones utilizadas o que la muestra de cinco clones no fue representativa.

Este fragmento se comparó con las secuencias conocidas utilizando como base de datos secuencias no redundantes del Gen-Bank+EMBL+DDBJ+PDB CBI. El fragmento presenta un alto grado de homología con todos los demás genes de las subunidades  $\beta$ , siendo la identidad en nucleótidos un 60 % con el gen CKB1 de *S. cerevisiae*; un 55 % con los genes que codifican para las subunidades  $\beta$  de gallina, de humano, de conejo y de

ratón; un 56 % con el gen CKB1 y un 55 % con el gen CKB2 de *A. thaliana*, es interesante destacar que esta secuencia no presenta homología con ninguna otra secuencia codificante para una proteína diferente de la subunidad  $\beta$  de la CK2.

<i>Sc</i> CKB1	<u>LYGLIHARFILTKPGLQAMA</u> <u>EKF</u> <u>DFHKEFGT</u> <u>CPRY</u> <u>CNGMQLLPCGLS</u> <u>DTV</u> <u>GKHTV</u>
<i>Sc</i> CKB2	<u>LYGLIHARYILTIKGLQ</u> <u>KMYAKYKEAD</u> <u>FGRC</u> <u>PRVY</u> <u>CNLQQLLPVGLHDI</u> <u>PGIDCV</u>
<i>Sp</i> CKB1	<u>LYGLIHARYILTAQGLY</u> <u>KMLEKYKK</u> <u>CD</u> <u>FGHC</u> <u>PRVLC</u> <u>NGQPMLPVGLSDIAHAKSV</u>
<i>At</i> CKB1	<u>LYGLIHARYILTSKGLA</u> <u>MLDKYK</u> <u>NYDF</u> <u>FGRC</u> <u>PRVY</u> <u>CCGQPCLPVGQSDLP</u> <u>RSSTV</u>
<i>At</i> CKB2	<u>LYGMIHARFILTSKGLA</u> <u>SMLDKYK</u> <u>NYDF</u> <u>FGRC</u> <u>PRVY</u> <u>CCGQPCLPVGQSDI</u> <u>PRASTV</u>
<i>Ce</i> $\beta$	<u>LYGLIHARYILTN</u> <u>RGISQ</u> <u>MVEKWRD</u> <u>HDFGVC</u> <u>PRVY</u> <u>CENQPMLPI</u> <u>IGQSDV</u> <u>PGEATV</u>
<i>Dm</i> Stellate	<u>WYGM</u> <u>IHARYIR</u> <u>SERGLIAM</u> <u>HRKLYR</u> <u>GDFG</u> <u>SCPNIS</u> <u>CDRQNTLPVGLSA</u> <u>AVWGKSTV</u>
<i>Dm</i> $\beta$	<u>LYGLIHARYILTN</u> <u>RGIAQ</u> <u>MI</u> <u>EKYQT</u> <u>GDFGHC</u> <u>PRVY</u> <u>CESQPMLPLGLSDI</u> <u>PGEAMV</u>
<i>Hs</i> $\beta$	<u>LYGLIHARYILTN</u> <u>RGIAQ</u> <u>M</u> <u>LEKY</u> <u>QQGDFG</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>PRVY</u> <u>CENQPMLPI</u> <u>IGLSDI</u> <u>PGEAMV</u>
<i>C. albicans</i>	<u>LYGLIHARYIVSKQ</u> <u>GLTAM</u> <u>ASK</u> <u>FER</u> <u>NDFG</u> <u>SC</u> <u>PRY</u> <u>FC</u> <u>DGMHLI</u> <u>PVGST</u> <u>DVPGQETV</u>
<i>Sc</i> CKB1	<u>RLYCP</u> <u>SCQDLYLPQ</u> <u>SSRFLC</u> <u>LEGA</u> <u>FWGT</u>
<i>Sc</i> CKB2	<u>KLYCP</u> <u>SCEDLYIPK</u> <u>SSRHSS</u> <u>IDGAY</u> <u>FGT</u>
<i>Sp</i> CKB1	<u>KLYCP</u> <u>RCEDVYTPK</u> <u>SQRHAS</u> <u>IDGAY</u> <u>FGT</u>
<i>At</i> CKB1	<u>KIYCP</u> <u>KCEDIYYPR</u> <u>SKYQGN</u> <u>IDGAY</u> <u>FGT</u>
<i>At</i> CKB2	<u>KIYCP</u> <u>KCEDVYYPR</u> <u>SKYQGN</u> <u>IDGAY</u> <u>FGT</u>
<i>Ce</i> $\beta$	<u>KLYCP</u> <u>RCNMVF</u> <u>PRSSRHQ</u> <u>HTDGS</u> <u>YFGT</u>
<i>Dm</i> Stellate	<u>KIHCP</u> <u>RCKSNF</u> <u>HPKS</u> <u>--DTQLD</u> <u>GAM</u> <u>FGP</u>
<i>Dm</i> $\beta$	<u>KTYCP</u> <u>KCIDVYTPK</u> <u>SSRHHHTD</u> <u>GAY</u> <u>FGT</u>
<i>Hs</i> $\beta$	<u>KLYCP</u> <u>KCMDVYTPK</u> <u>SSRHHHTD</u> <u>GAY</u> <u>FGT</u>
<i>C. albicans</i>	<u>RLF</u> <u>CP</u> <u>CCNDI</u> <u>YI</u> <u>P</u> <u>SS</u> <u>SR</u> <u>YLN</u> <u>IDGAY</u> <u>FGT</u>

### Figura R-21

El fragmento obtenido se tradujo a proteínas, teniendo en cuenta el cambio del uso del código genético de esta levadura, y se comparó con las regiones correspondientes de las subunidades  $\beta$  de diferentes organismos. Los aminoácidos idénticos en todas las secuencias se encuentran subrayados, y el único cambio en estos aminoácidos consenso encontrado en la secuencia de *C. albicans* se señala en azul. *Sc*: *S. cerevisiae*, *At*: *A. thaliana*, *Ce*: *C. elegans*, *Dm*: *D. melanogaster*, *Hs*: *H. sapiens*.

La secuencia nucleotídica se tradujo a aminoácidos. Cabe destacar que *C. albicans* presenta un cambio en el uso de codones universales. Mientras que para la mayoría de los organismos el codón CUG codifica para Leu, en *C. albicans* lo hace para Ser. Sin embargo la frecuencia de este codón en *C. albicans* es muy baja, y no se encontró en ninguna de las secuencias analizadas en este trabajo.

La secuencia traducida a aminoácidos se comparó con la base de datos no redundante del Gen-Bank CDS translations + PDB + Swiss Prot + Spupdate + PIR (**figura R-21**). Nuevamente la comparación señala el mayor índice de homología con la subunidad  $\beta$  de *S. cerevisiae* (un 58 % de identidad y un 82 % de homología), mientras que en segundo lugar se encuentra la subunidad  $\beta'$  del mismo organismo (un 57 % de identidad y un 77 % de homología). Cabe destacar que la comparación de la secuencia de aminoácidos tampoco presenta homologías con proteínas diferentes a las subunidades regulatorias de la CK2.

Como se puede observar en la **figura R-21** la secuencia deducida de *C. albicans* contiene todos los aminoácidos conservados en los genes de todas las subunidades  $\beta$  conocidos hasta el momento, a excepción de una sustitución de una L por un I en la posición 42, aunque este cambio es conservativo.

En un intento de obtener el clon completo de alguna de las subunidades regulatorias de la CK2 de *C. albicans* se procedió a marcar este fragmento radioactivamente como se detalla en el punto 14.3 de materiales y métodos y utilizarlo como sonda radioactiva para analizar la presencia del clon de interés en una biblioteca de ADNcopia de *C. albicans* construida en  $\lambda$  ZAP II. Esta aproximación no produjo resultados positivos.

En un nuevo intento de obtener el clon completo de las subunidades en cuestión aprovechamos la ventaja de contar con la biblioteca de ADNcopia que al estar construida en  $\lambda$  ZAP II contiene todas las secuencias clonadas flanqueadas por los promotores universales T7 y T3. Utilizamos entonces el ADN de la biblioteca como molde para una reacción de PCR en las cuáles se probaron 5 mezclas de primers diferentes : P1-P2; P1-T7; P2-T3; P1-T3; P2-T7. En la **figura R-22** se observan los productos obtenidos. La amplificación un fragmento del tamaño esperado a partir de la mezcla de primers P1-P2 indicaría que el o los clones estan representados en la biblioteca. La mezcla de primers P1-T7 permite la amplificación de un fragmento mayoritario, de 600pb, mientras que la mezcla de primers P2-T3 da productos de amplificación de diversos tamaños. Para corroborar que la secuencia buscada estaba dentro de estos productos de amplificación, se

procedió a la re-amplificación de estos fragmentos utilizando ahora los primers P1-P2. Esta reacción dio resultado positivo en ambas mezclas, (resultados no mostrados).

La mezcla de fragmentos obtenidos con P1-T7 se subclonó en el vector pGEM-T easy vector de Promega se transformaron *E. coli* como se describió anteriormente.

De algunas de las colonias que dieron blancas se obtuvieron mini preparaciones de ADN plasmídico y se consideraron positivos aquellos cuya re-amplificación con la mezcla de primers P1-P2 producía el fragmento del tamaño esperado. De 10 clones analizados uno dió positivo y se mandó a secuenciar.

La secuencia obtenida para el fragmento 3' del gen se observa en la **figura R-23**

```
TTGTATGGTTTGATACATGCCAGATACATAGTCTCCAACAAGGTCTTAACTGCCATGGCAT
CCCAAGTTTGGAGAGAAACGACTTTGGCTCTTGTCCAAGATATTTTTGTGACGG
TATGCATTTAATTCCTGGTGGGTCGACTGATGTGCCGGGACAAGAAACGGTGAG
ATTGTTTTGTCCTTGCTGTAATGATATCTATATACCTTCCAGTTCGAGGTATTT
GAATATTGATGGTGCATTCTTTGGAAACGACGTTTTCTGGACTATTGGTGAAGAT
GTTTCCCGAGATTGAAAACCAGTGTTAGAATAAGAATAACAAAGTTTAGTCAGAA
TGATTTTGGGCTAAAATTGTTTGGGTTCAAATCAACGAGTTGAGTGCCACCGG
TCCAAGAATGAAATGGCTAAGAATGCATCCAGAGACAGAAGGTGAAAAACAAGA
GTTGACTCATGTGAATATAATGTTCCAATTAGCTACTTATATGAAGACGAAGAG
GATGGAAGAAGACGACGAAGAAGAAGAAGACGAAGTGGAAGAAGAAGATGACGA
TCGNACAATGGCCAGCGAGTAAAGAAACGTATAAAAANGGAAAGAATAATNGACG
TATATGTGTGTGNGTGTACATCTTTTCGNGGNTAANTTTAAATNTAAAGAGNTA
AATAATAGCTTACTTAAATAAAAGGGGGGGCCCGGTACCCAATTCGCCCTATAG
TGAGTNGTATTA
```

**Figura R-23. Secuencia de la región 3' del gen**

Los fragmentos amplificados a partir de los primers P1 y T7, utilizando como molde el ADN de la biblioteca de ADNcopia en  $\lambda$  ZAP II se subclonaron en el vector pGEM-T easy. El clon que llevaba el fragmento de interés se secuenció y la secuencia de ve en la figura. En rojo esta marcado el primer P1, en verde el primer P2 y en azul el primer T7. En rosa está marcada la secuencia que se utilizó para la síntesis del primer P5, éste incluye el primer codón stop encontrado en la secuencia.

La secuencia del primer fragmento (entre los primers P1-P2) se encuentra íntegra e idéntica en esta nueva secuencia obtenida y continúa en un marco de lectura abierto que termina con un codón stop en fase, seguido de dos codones stop más en fase, podemos decir entonces que tenemos la mitad de uno de los genes en cuestión.

Se intentó el clonado del gen completo aprovechando el conocimiento de la región 3', utilizando un primer que contiene el codón stop (primer P5) (ver figura R-23 y punto 14.1 de materiales y métodos). Se utilizó como templado el ADN de la biblioteca de ADNcopia de *C. albicans* y el primer universal T3.

La amplificación a partir de los primers T3 y P5 dió como resultado un fragmento de 1000 pb aproximadamente, (resultados no mostrados).

Luego de proceder como se describió para la región 3' del gen se obtuvo un clon que daba positivo para la reamplificación de un fragmento de 249 pb a partir de P1 y P2. Este clon se mandó a secuenciar.

La **figura R-24** presenta la secuencia nucleotídica del marco de lectura abierto más largo, 895 pb, localizado en fase con un codón stop 27 pb hacia el 5' de la metionina inicial. La secuencia aminoacídica deducida va desde la primera metionina hasta el primer codon stop. La traducción hipotética de este marco abierto de lectura produce una proteína de 294 aminoácidos con una masa molecular calculada de 33.789 Da y un punto isoeléctrico teórico de 4,53.

```

ccattgataaaacaagaacggaaaaaaaaaattaagattaacatagctttgccgtgatatcaactaca
atgcctagcgcgatccagaagaagactatataccttggatacaacagcctttgtgaattgttt
M P S D P E E D Y I P W I Q Q L C E L F
ggtcacgattatgttacaggtgtcacaggactttattgaagatgatttcaatctaact
G H D Y F V Q V S Q D F I E D D F N L T
ggattgtctctgcaagtaccttattatagagaagcattatacacaatattggattaccaa
G L S L Q V P Y Y R E A L Y T I L D Y Q
gttgaaacggcagaagatcataaactgacaatacaaccaccaataccagcaataacaat
V E T A E D H N T D N T T T N T S N N N
gattcacggaatggtacaagtaaacgaaatgcatcagaattgccaaacaagcgttattg
D S R N G T S K R N A S E L P N K A L L
gcacattctgcagaattattatattggttaatccatgccagatacatagtctccaacaa
A H S A E L L Y G L I H A R Y I V S K Q
ggtctaactgccatggcacaagtttgagagaaacgactttggctcttgccaagatat
G L T A M A S K F E R N D F G S C P R Y
ttttgtgacggtatgcatttaattcctgttgggtcgactgatgtgccgggacaagaacg
F C D G M H L I P V G S T D V P G Q E T
gtgagattgtttgtccttgccttgcctgtaatatctatataccttccagttcgaggtattg
V R L F C P C C N D I Y I P S S S R Y L
aatattgatggtgcattccttggaaacgacgcttccctggactattggtgaagatgtttccc
N I D G A F F G T T F P G L L V K M F P
gagattgaaaaccagtgtagaataagaataacaaagtttagtcagaatgattttgggcta
E I E N Q C R I R I T K F S Q N D F G L
aaattgtttgggttcaaaatcaacgagttgagtgccaccgggtccaagaatgaaatggcta
K L F G F K I N E L S A T G P R M K W L
agaatgcatccagagacagaaggtgaaaaacaagagttgactcatgtgaatataatgttc
R M H P E T E G E K Q E L T H V N I M F
caattagctacttatatgaagacgaagaggatggaagaagacgacgaagaagaagaagac
Q L A T Y M K T K R M E E D D E E E E D
gaagtggaagaagaagatgacgatcgnacaatggccagcgagtaa
E V E E E D D D X T M A S E -

```

**Figura R-24** *Secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos deducida de CaCKB1*

La figura muestra la secuencia nucleotídica del fragmento amplificado a partir de los primers P5 y T3 y la secuencia deducida de aminoácidos utilizando el código de una letra. Un codón stop ubicado en marco con la primera metionina 27 nucleótidos río arriba se señala subrayado.

El alineamiento de la secuencia de la subunidad  $\beta$  de *C. albicans* con las secuencias conocidas se puede observar en la **figura R-25**. La secuencia aminoacídica contiene todas las regiones conservadas en la otras subunidades clonadas hasta el momento, estas incluyen el sitio de autofosforilación en la región N-terminal ( $^1\text{MPSDPEED}^8$ ) y el sitio putativo de unión a metales ( $\text{CPX}^3\text{C-X}^{22}\text{-CPX}^1\text{C}$ ). La región implicada en la dimerización de las subunidades  $\beta$  (Boldyreff y col. 1996) se encuentra también en la subunidad de *C. albicans*  $^{185}\text{GAFFGTTFPG}^{194}$ . Por otra parte, el conjunto de

aminoácidos ácidos que se encuentran en las proximidades de la posición 60 en la mayoría de las subunidades  $\beta$ , a la cual se le atribuyen el sitio de unión a poliaminas y un efecto en la regulación negativa, en la subunidad de *C. albicans* no está presente tan claramente, si bien el segmento que va desde la posición 59 hasta la 71 tendría una carga neta negativa (<sup>59</sup>DYQVETAEDHNTD<sup>71</sup>).

La masa molecular deducida de la subunidad de *C. albicans* (33,7 kDa) la sitúa como la de mayor tamaño con respecto a la subunidades  $\beta$  clonadas hasta el momento. Esto se debe a una gran inserción en el centro de la proteína, tal como sucede en la subunidad  $\beta$  de *S. cerevisiae*, y a una gran extensión hacia el extremo C-terminal de la proteína, a diferencia de lo que sucede en las otras subunidades  $\beta$  que presentan extensiones hacia el extremo N-terminal (ver figura R-25).

Una característica única de la subunidad  $\beta$  de *C. albicans* es un conjunto de aminoácidos ácidos en el extremo C-terminal (<sup>272</sup>EEDDEEEDEVEEEDDD<sup>288</sup>).

En cuanto a los sitios de fosforilación por otras quinasa no están presentes la T 145, la T 154, y la S 209 que en la subunidad  $\beta$  humana son blancos de fosforilación para la cdk, la PKA y la cdc 2 respectivamente.

At CKB1 MYRDRGTVNSRPEVVD  
 At CKB2 MYRERGMVGSKEVVD

Sc CKB1 MSGEFVEDYSRT  
 At CKB1 RKRINDALE-RPSPSTSRQVNGKGGKIVTAATTTANLIGKQSNINHRDSRSASISKNNIVSD-DESDTDSE  
 At CKB2 RKRINEIHDNRPSHMSQPVNGKGGK-----VTSTSVIMGKQQLHD--KESSRSGSISKTNLSDAVIDSDTDSE  
 Sp beta MQ  
 Sc CKB2 MGSRSENVGTVTRGSRVEQDDVL

Ca CKB1 MPSPDEED--YIPWIQQLCLELFGHDYFVQVSQDFIEDDENLTLGLSLQVPYREALYTTILDYQVETAEDH  
 Sc CKB1 GSSDDEDSGAYDEWIPSFCSRFGHEYFCQVPTEFTIEDDENMTSLSQEVPHYRKALDLILDLEAMSDEEE  
 Hs beta MSSSEEVSVSWISWFCGLRGNEFFCEVDEEYTDKFNLTGLNEQVPHYRQALDMLDLEPDEELED  
 Ce beta MSSSEEVWITWFCGLRGNEFFCEVDEEYTDKFNLTGLNEQVPKYRQALDMLDLEPDDIEDN  
 Dm beta MSSSEEVSWIWFVFCGLRGNEFFCEVDEEYTDKFNLTGLNEQVPNYRQALDMLDLEPEDELED  
 At CKB1 ESDVSGSDGEDTSWISWFCNLRGNEFFCEVDDDYTDKFNLCGLSSIVPYEYALDLILDVSSQGEFMF  
 At CKB2 ESEVSGSDGEDTSWISWFCNLRGNEFFCEVDDDYTDKFNLCGLSHQVPYDYALDLILDVSSHGEMF  
 Sp CKB1 LYSSESESDDSQYVVDWFLGLKGNFFCEVDEDFTDKFNLTGLSHEVPHYSQSLDLILDVLDLDPDLPEE  
 Sc CKB2 MDDSDSDSEYVDMWIDLFLGRKGHEYFCVDPEYITDRFNLMNLQKTVSKFSYVVOYITVDDLDDSDILEN

Ca CKB1 NTDNITTTNTS-----NNNDSRNGTSKRNASLEPNKALLAHSAAELLYGLIHHARYTVSKQGLTAMASK  
 Sc CKB1 DEDDVVEEDEVQEMQSNQDGHDEGKRNRKSPVVKNSIIEHAAEQLYGLIHHARFILTTPKGLQAMAQK  
 Hs beta N-----PNQSDLI EQAAEMLYGLIHHARYILTNRGLAQMLEK  
 Ce beta AT-----NTDLVEQAAEMLYGLIHHARYILTNRGLSQMVEK  
 Dm beta NPLQSD-----MTEQAAEMLYGLIHHARYILTNRGLAQMLEK  
 At CKB1 -----TEEQNE-----LIESAAEMLYGLIHHARYILTSTKGLAAMLDK  
 At CKB2 -----TEEQNE-----LIESAAEMLYGMTHARFILTSTKGLASMLDK  
 Sp CKB1 VQDEVEA-----SA-RHLYGLIHHARYILTAAQGLYKMLEK  
 Sc CKB2 MITHARLEQLES-----DS-RKLYGLIHHARYIITIKGLQKMYAK

Ca CKB1 FERNDFGSCPRYFCDGMHLIPVGSTDVPQGETVRLFCPCQNDIYIPSSSRYLNIDGAFGGTTFPGL  
 Sc CKB1 FDHKEFGICPRYVCNGMQLLPCGLSDTVGKHTVRLYCPSCQDLYLPQSSRFLCLEGAFWGTSPFPGV  
 Hs beta YQGGDFGYCPRVYCNQPMLEPIGLSDIPGEAMVKLYCPKCMVYTPKSSRHHHTDGAIFYGTGFPHM  
 Ce beta WRDHDFFGVCPRVYCNQPMLEPIGLSDVPGEAMVKLYCPCRCNMVFPVPRSRHQHTDGSYFGTGFPHM  
 Dm beta YQTGDFGHCPRVYCESQPMLEPIGLSDIPGEAMVKTYCPKCIDVYTPKSSRHHHTDGAIFYGTGFPHM  
 At CKB1 YKNYDFGRCPRVYCCGQPCLPVQSDLPSSSTVKIYCPKCEDIYPRSKYQGNIDGAYFGTTFPHL  
 At CKB2 YKNYDFGRCPRVYCCGQPCLPVQSDIPRSTVKIYCPKCEDVYPRSKYQGNIDGAYFGTTFPHL  
 Sp CKB1 YKKCDFGHCPRVLCNGQPMLEPIVGLSDIAHAKSVKLYCPCRCEDVYTPKSORHASIDGAYFGTGFPHM  
 Sc CKB2 YKEADFFGRCPRVYCNLQQLLPVGLHDI PGIDCVKLYCPCSCEDLYIPKSSRHSSIDGAYFGTSPFPGM

Ca CKB1 LVKMFPEIENQCRIKITKFSQNDFGLKLFKFKINELSATGPRMKWLRMHPETEGEKQELTHVNIMF  
 Sc CKB1 FLKHFKLEEEY----VERKSKESYELKVFGRINDEAVSGPRMKWLRQYPSTEDWEEFAKCEFETPAV\*  
 Hs beta LFMVHPEYR-----PKRANQFVPRLYGFKIHAMAYQLQLQAASNFKSPVKTIR\*  
 Ce beta LFFVHPDL--RPRRFVTQFV-----KLYGFKIHPVAYGG  
 Dm beta LFMVHPEYR-----PKRPTNQFVPRLYGFKIHSLAYQIQLOAAAANFKMPLRAKN\*  
 At CKB1 FLMTYG-----HLKPAKATQN-YVQRVFGFKLHKP\*  
 At CKB2 FLMTYGHKLPQ-----KASQS-YTQRVFGFKLHKP\*  
 Sp beta LFQVYPEL-----AVPKSQERYIPRIFGFKVHSYSATFKKQDVYKEKQKKRLOGAEAESKNKLAIT\*  
 Sc CKB2 FLQAFQPM-----VPKHPTKRYVPKIFGFKELHKQAQLTRWQELQRLKLVKLESKDVDLTKSGGFKT\*

Ca CKB1 QLATYMKTKRMEEDDEEEDEVEEEDDDXTIMASE\*

**Figura R-25 Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las diferentes subunidades β.**  
 Las secuencias que se muestran y sus números de acceso del GenBank son *S. cerevisiae* CKB1 (U21283) y CKB2 (U08849), *S. pombe* beta (X74274), *A. thaliana* CKB1 (L22563) y CKB2 (U03981), *C. elegans* beta (M73827), *D. melanogaster* beta (M16535) y *H. sapiens* beta

(X16312). Como la subunidad beta de *Gallus gallus* (M59458), *Mus musculus* (X52959) son un 100% idénticas a la de *H. sapiens*, y la de *Xenopus laevis* (X62376) contiene un único reemplazo con respecto a la de *H. sapiens* éstas secuencias no fueron incluidas en el alineamiento. El asterisco indica el fin de la secuencia y las rayas significan los “gaps” introducidos para mantener la alineación. En **negrita** se indican los aminoácidos conservados en todas las secuencias, mientras que los que no se encontraron en la secuencia de *C. albicans* se indican en azul. La secuencia de *C. albicans* se indica en rojo.

La secuencia traducida a aminoácidos se comparó con la base de datos no redundante del Gen-Bank CDS translations + PDB + Swiss Prot + Spupdate + PIR y los resultados se pueden observar en la **tabla R-V**.

**Tabla R-V Comparación de la secuencia aminoacidica del gen clonado de *C. albicans* con las subunidades  $\beta$  conocidas hasta el momento**

Fuente	% Identidad	% homología	% “gaps”
<i>S.cerevisiae</i> CKB1 ( $\beta$ )	47	86	4
<i>C. elegans</i> $\beta$	40	61	14
<i>Homo sapiens</i> $\beta$	39	60	15
<i>Danio rerio</i> =zebrafish $\beta$	39	60	15
<i>D. melanogaster</i> $\beta$	38	56	14
<i>A. thaliana</i> CKB1	40	56	14
<i>A. thaliana</i> CKB2	39	56	14
<i>S.cerevisiae</i> CKB2 ( $\beta'$ )	35	53	13

La secuencia traducida a aminoácidos se comparó con la base de datos no redundante del Gen-Bank CDS translations + PDB + Swiss Prot + Spupdate + PIR. El % de identidad se refiere a los aminoácidos idénticos, el % de homología tiene en cuenta los cambios conservativos y el % de “gaps” son los lugares que se debieron dejar libres para conservar la alineación.

La subunidad de *C. albicans* presenta el mayor porcentaje de homología con la subunidad  $\beta$  de *S. cerevisiae* mientras que con la subunidad  $\beta'$  del mismo organismo presenta el porcentaje de homología menor. Por otro lado, la masa molecular teórica de la proteína deducida del gen de *C. albicans*, 33,7 kDa, se aproxima a la masa molecular de la subunidad  $\beta$  (36 kDa). Teniendo en cuenta estos resultados podemos inferir que hemos clonado el gen de la subunidad  $\beta$  de *C. albicans* (CaCKB1).

Recientemente dos laboratorios de Estados Unidos, en conjunto, han comenzado con el proyecto de secuenciación del genoma de *C. albicans*, estando las secuencias depositadas en la dirección <http://alces.med.umn.edu>

En febrero de 1998 se ha depositado en dicho sitio una secuencia parcial que presenta homología con el gen CKB2 de *S. cerevisiae*. Con el objetivo de analizar si dicha secuencia coincidía con el gen CaCKB1 identificado en este trabajo se procedió a comparar ambas secuencias.

Como se puede ver en la **figura R-26** ambas secuencias presentan los aminoácidos consenso presentes en las subunidades  $\beta$  conocidas hasta el momento, sin embargo difieren sustancialmente entre ellas, sugiriendo la existencia de al menos dos genes en el genoma de *C. albicans* que codificarían para las subunidades regulatorias de la CK2.

```
CaCKB1      MPSDPEEDYIPWIIQQLCELFGHDYFVQVSQDFIEDDFNLTGL
CaCKB2 MANEEYVTDSSSDFTEYWIDLFLGIIGNEYFCDID-DEYIDRFNLTGL

CaCKB1 SLQVPYYREALYTILDYQVETAEDHNTDNTT
CaCKB2 NSEVSKLPILIDIITDVIDIESQPEEHEDSL
```

**Figura R-26** Comparación entre la secuencia aminoacidica de la subunidad  $\beta$  de *C. albicans* y la secuencia aminoacidica deducida de una secuencia parcial con homología con CKB2 de *S. cerevisiae*.

La secuencia de aminoácidos del gen CaCKB1 se alineó con la secuencia de aminoácidos deducida de una secuencia parcial del proyecto genoma de *C. albicans* que presenta homología con CKB2 de *S. cerevisiae* (CaCKB2). Los aminoácidos presentes en todas las subunidades  $\beta$  se encuentran subrayados, y los guiones representan los “gaps” introducidos para mantener la alineación.

### Integración

Mediante la amplificación por PCR y el uso de primers específicos hemos logrado el clonado de un gen que codifica para una subunidad regulatoria de la CK2.

Debido al alto porcentaje de homología que presenta dicha secuencia con la subunidad  $\beta$  de *S. cerevisiae* (86%), inferimos que hemos clonado el gen de la subunidad  $\beta$  de *C. albicans*. Esta aseveración se ve reforzada por el hecho que la masa molecular

teórica del polipéptido codificado por el gen *CaCKB1* está en el orden del de la proteína de 36kDa identificada como el componente regulatorio  $\beta$  por inmunoreactividad cruzada con el anticuerpo anti-subunidad  $\beta$  de *D. melanogaster*.

El valor de 33,7 kDa deducido para esta proteína la sitúa como la de mayor peso molecular con respecto a las subunidades  $\beta$  conocidas hasta el momento. Este tamaño se debe a una inserción en la región central de la proteína y a una extensión hacia el extremo C terminal ( ver figura R-27).

El análisis de la secuencia nos permite decir que la subunidad  $\beta$  de *C. albicans* presenta la mayoría de los aminoácidos consenso de las demás subunidades  $\beta$  (figura R-27), incluyéndose el sitio de autofosforilación en el extremo N-terminal de la proteína (<sup>1</sup>MPSDPEED<sup>8</sup>) y el sitio putativo de unión a metales (CPX<sup>3</sup>C-X<sup>22</sup>-CPX<sup>1</sup>C).

Por otro lado esta proteína presenta en su extremo C-terminal un conjunto de aminoácidos ácidos (<sup>272</sup>DDEEEEDEVVEEEDDD<sup>288</sup>), el significado de esta región no se conoce.

Por otro lado los sitios de fosforilación por otras quinasas que se encuentran presentes en la secuencia de la subunidad  $\beta$  humana no aparecen en la secuencia de *C. albicans*, aunque como se puede ver en la figura R-25, esto mismo sucede con muchos otros organismos. Si estas fosforilaciones se dan o no en la subunidad  $\beta$  humana es motivo de estudio.

La comparación de la secuencia *CaCKB1*, obtenida en este trabajo, con una secuencia publicada en el proyecto secuenciación del genoma de *C. albicans* que presenta homología con la subunidad  $\beta'$  de *S. cerevisiae* sugiere que en el genoma de *C. albicans* existen al menos dos genes que codifican para las subunidades regulatorias de la CK2.

## DISCUSIÓN GENERAL

A continuación se resumen algunos aspectos de este trabajo, que se consideraron relevantes en cuanto al estudio de la CK2:

En la primera parte del trabajo se estudió la actividad de la CK2 en diferentes estadios de crecimiento del hongo *C. albicans*. En concordancia con los antecedentes conocidos en cuanto a la actividad de la CK2 en cultivos proliferativos se observó un aumento de la actividad de CK2 en cultivos en fase logarítmica de crecimiento. La implicancia de esta enzima en el establecimiento del crecimiento hifal no se pudo demostrar, aunque con el estudio realizado no se puede descartar su participación.

La purificación a aparente homogeneidad de la CK2 del hongo y su caracterización permiten afirmar que la enzima de *C. albicans* presenta la mayor parte de las características distintivas de las CK2 de diferentes organismos, tales como la capacidad de fosforilar el péptido específico RRRADDSDDDDD, la fosforilación de la caseína en residuos de serina y treonina, la fosforilación de la calmodulina en forma absolutamente dependiente de polilisina, la utilización con eficiencia similar tanto de GTP como ATP como dadores de grupos fosfato, la extrema sensibilidad a la inhibición por heparina, y la capacidad de ver estimulada su actividad por compuestos policatiónicos tales como polilisina, espermina y espermidina.

Se estudió la estructura molecular de a CK2 purificada a aparente homogeneidad de células levaduriformes de *C. albicans*, ésta presenta una forma heterotetramérica con un peso molecular aparente de 159 kDa en su forma nativa, con una estructura heterotetramérica del tipo  $\alpha \alpha' \beta \beta'$ , con dos subunidades catalíticas diferentes,  $\alpha$  y  $\alpha'$ , de 39 y 37 kDa respectivamente, y dos subunidades regulatorias,  $\beta$  y  $\beta'$ , con pesos moleculares aparentes inusualmente altos de 36 y 44 kDa respectivamente. La presencia de dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  diferentes sólo se había descripto para la holoenzima de *S. cerevisiae*.

Para intentar corroborar la existencia de dos genes diferentes para las subunidades regulatorias de la CK2 se abordó el clonado de dichos genes. Se ha logrado el clonado de un gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la CK2 (*CaCKB1*). La secuencia deducida presenta un 86 % de homología a nivel de aminoácidos con la subunidad  $\beta$  de *S. cerevisiae*, conteniendo la mayoría de las secuencias consenso presentes en las subunidades  $\beta$  conocidas hasta el momento. Como característica propia puede mencionarse un grupo de 16 aminoácidos ácidos en el extremo C terminal.

Aunque hemos sido capaces de clonar sólo uno de los genes, la comparación de la secuencia deducida de aminoácidos del gen *CaCKB1* identificada en este trabajo con la secuencia depositada del proyecto secuenciación de *C. albicans* sugiere la existencia de al menos 2 genes diferentes que codifican para las subunidades regulatorias de la CK2 de *C. albicans*.

Por otro lado se encaró el estudio de la fosforilación del proteasoma 20S de *C. albicans* como sustrato endógeno. Se logró una fosforilación eficiente de la partícula 20S utilizando la CK2 homóloga purificada, en numerosas subunidades, presentando un valor para la  $K_m$  del orden de nM. Esta fosforilación es absolutamente dependiente de polilisina, ésta sería una característica peculiar de los proteasomas de levaduras, ya que en *S. cerevisiae* (Pardo y col., 1998) se observa el mismo comportamiento, a diferencia de lo que ocurre en mamíferos (Ludermann y col., 1993; Castaño y col., 1996).

La banda mayoritariamente fosforilada en el proteasoma 20S se identificó como la subunidad  $\alpha 7/C8$ . La existencia de más de un sitio de fosforilación dentro de la subunidad  $\alpha 7/C8$  se ve sugerida por los siguientes resultados: i) la estequiometría de la fosforilación, ii) el inmunoreconocimiento de tres formas en el gel de dos dimensiones, iii) la detección de fosfotreonina y fosfoserina en la subunidad  $\alpha 7/C8$ .

## PERSPECTIVAS

Los resultados mencionados en este trabajo abren numerosas posibilidades en cuanto al estudio de la regulación de la actividad de la CK2. Algunos de los puntos a encarar en adelante serían:

El estudio de la subunidad regulatoria  $\beta'$ . Los antecedentes mencionados en este trabajo prueban la existencia de dos subunidades regulatorias diferentes en la CK2 de *C. albicans*. Debido al poco conocimiento que se tiene hasta el momento en cuanto a posibles diferencias en la capacidad regulatoria de las diferentes subunidades  $\beta$ , se impone el clonado de la subunidad  $\beta'$ , la expresión de ambas subunidades, el estudio de la capacidad de cada una de éstas de reconstituir la holoenzima (utilizando la subunidad catalítica  $\alpha$  de la CK2 humana, cuyo clon ya se encuentra en el laboratorio) y la posterior caracterización de cada una de las holoenzimas, para ver si se puede atribuir a cada una de ellas un rol diferencial al menos *in vitro*.

Por otro lado, el estudio de la actividad *in vivo* de las subunidades regulatorias por complementación con una cepa de *S. cerevisiae* cuyo genotipo es *ckb1<sup>-</sup>* y *ckb2<sup>-</sup>* (Bidwai y col., 1995) sería de suma utilidad para dilucidar los roles de estas subunidades *in vivo* y postular un posible mecanismo de acción para cada una de ellas. En *S. cerevisiae* la doble mutante *ckb1<sup>-</sup> ckb2<sup>-</sup>* presenta un fenotipo sensible a la sal, idéntico al que presentan cada una de las simples mutantes (*ckb1<sup>-</sup>* o *ckb2<sup>-</sup>*), indicando que ambas proteínas son responsables del fenotipo observado. La sensibilidad de la cepa *ckb1<sup>-</sup>* es parcialmente revertida por la transformación con ADNcopia del gen *CKB2*, aunque lo contrario no se da (Glover, 1998). Todos estos datos tomados en conjunto sugieren un rol diferente para cada una de las subunidades regulatorias. La capacidad de las respectivas subunidades de *C. albicans* de revertir el fenotipo mencionado hablaría de un mecanismo conservado, al menos en levaduras.

## ***BIBLIOGRAFIA***

## **BIBLIOGRAFIA**

- Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Shimbara, N., Takashina, M., Kristensen, P., Hendil, K. B., Tanaka, K., Ichihara, A., FEBS Lett. 343:85-88; 1994**
- Allende, J. E. y Allende, C. C., FASEB J. 9:314-323, 1995**
- Amsterdam, A., Pitzer, F., Baumeister, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:99-103; 1993**
- Anderson, M. Odds, F. Mycosen 28:531-540; 1985**
- Antonelli, M., Daniotti, J. L., Rojo, D., Allende, C. C., Allende, J. E., *Eur. J.Biochem.* 241:272-279; 1996**
- Arrigo, A. P., Mehlen, P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:1387-1393; 1993**
- Bidwai, A. P., Reed, J. C., Glover, C.V.C., *Arch. Biochem. Biophys.* 300:265-270; 1993**
- Bidwai, A. P., Reed, J. C., Glover, C.V.C., *Arch. Biochem. Biophys.* 309:348-355; 1994**
- Birnbaum, M. J. y Glover, C. V. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181:524-528; 1991**
- Bodenbach, L., Fauss, J., Robitzki, A., Krehan, A., Lorenz, P., Lozeman, F. J., Pyerin, W., *Eur. J. Biochem.* 220:263-273; 1994**
- Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L. A., Issinger, O. G., *Biochemistry* 32:12672-12677; 1993**
- Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L. A., Issinger, O. G., *Cell. Mol. Biol. Res.* 40:391-399; 1994a**
- Boldyreff, B., Meggio, F., Pinna, L. A., Issinger, O. G., *J. Biol. Chem.* 269:4827-4831; 1994b**
- Boldyreff, B., Mietens, U., Issinger, O. G., *FEBS Lett.* 379:153-156; 1996**
- Bonnet, H., Filhol, O., Truchet, I., Brethenou, P., Cochet, C., Amalric, F., Bouche, G., *J Biol. Chem.* 271:24781-24787, 1996**
- Braun, B. R., Johnson, A. D., *Science* 277:105-109; 1997**
- Burnett, G. y Kennedy, E. P., *J. Biol. Chem.* 211:969-980; 1954**
- Castaña, J. G., Mahillo, E., Aritzi, P., Arribas, J., *Biochemistry* 35:3782-3789; 1996**
- Castilla, R., Passeron, S. Cantore, M. L. *Cellular Signaling* ;1998**
- Chen M., Li D., Krebs E. G., Cooper J. A., *Mol Cell Biol* 17:1904-1912; 1997**
- Ciechanover, A., *Cell*, 79:13-21; 1994**
- Cochet, C., Chambaz, E. M., *J. Cell. Biol.* 258:1403-1406; 1983**
- Cochrane A., Golub E., Volski D., Ruben S., Rosen C. A., *J. Virol* 63:4438-4440; 1989**

**Cochrane A., Kramer R., Ruben S., Levine J., Rosen C. A.** *Virology* 171:264-266; 1989b

**Collet, M., Erickson, R.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75:2021-2024; 1978

**Collinge, M. A. y Walker, J. C.,** *Plant Mol. Biol.* 25:649-658; 1994

**Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A. L.,** *Annu. Rev. Biochem.* 65:801-847; 1996

**Dahmus, M. E.** *J. Biol. Chem.* 256:3332-3339; 1981

**Daniotti, J. L., Allende, M. L., Weinberg, E. S., Allende J. E.,** *Cell. Mol. Biol. Res.* 40:431-439; 1994

**De Paoli-Roach, A.A., Ahmad, Z., Roach, P. J.,** *J. Biol. Chem.* 256:8955-8962; 1981

**Dei-Cas, E., Vernes, A.,** *Critical Reviews in Microbiology* De. O' Leary, W. vol. 13 pp 173, CRC Press, Florida; 1986

**Dobrowolska, G., Meggio, F., Marin, O., Lozeman F. J., Dongxia, L., Pinna, L. A., Krebs, E. G.** *FEBS Lett.* 355:237-241; 1994

**Dobrowolska, G., Meggio, F., Szczegieliak, J., Muszynska, G., Pinna, L. A.,** *Eur. J. Biochem.* 204:299-303; 1992

**Egidy, G, Paveto, M. C., Passeron, S. Galvagno, M. A.** *Cell. Biol. Int. rep.* 14:59-68; 1990

**Egidy, G., Paveto, M. C., Passeron, S., Galvagno, M. A.** *Exp. Mycol.* 13:428-432; 1989

**Fernández Murray, P., Samela, A., Passeron, S.** *Exp. Mycol.* 16:279-291; 1992

**Fields S., Song, O.** *Nature* (London), 340:245-246, 1989

**Filhol, O., Cochet, C., Wedegaertner, P., Gill, G. N., Chambaz E. M.** *Biochemistry,* 30:133-140, 1993

**Fisher, E. y Krebs, E.** *J. Biol. Chem.* 216,121-135; 1956

**Gatica, M., Jacob, G., Allende, C. C., Allende, J. E.,** *Biochemistry* 34:122-127; 1995

**Gimeno, C. J., Ljungdahl, O. P., Styles, C. A., Fink, G. R.** *Cell* 68:1067-1090; 1992

**Glover, C. V. C., Shelton, E. R., Brutlag, D. L.,** *J. Biol. Chem.* 258:3258-3265; 1983

**Gotz, C., Wagner, P., Issinger, O.-G., Montenarh, M.,** *Oncogene* 13:391-398; 1996

**Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D., Huber, R.** *Nature* 386:463-471; 1997

**Guerra, B., Gotz, C., Wagner, P., Montenarh, M., Issinger O-G,** *Oncogene* 14:2683-2688; 1997

**Haas, C.,** Pesold-Hurt, B., Multhaup, G., Beyreuther, K., Kloetzel, P. M. *EMBO J.* 8:2373-2379; 1989

**Hagemann C.,** Kalmes A., Wixler V., Wixler L., Schuster T, Rapp U. R., *FEBS Lett* 403:200-202, 1997

**Hammarsten,O.,** *Z. Physiol. Chemie.* 7:227; 1883

**Hanna, D. E.,** Rethinaswamy, A., Glover, C. V. C. *J. Biol. Chem.* 270:25905-25914, 1995

**Hathaway G. M.,** Lubben, T. H., Traugh, J. A., *J. Biol. Chem.* 255:8038-8041; 1980

**Hathaway G. M.,** Traugh, J. A., *Curr. Top. Cell. Regul.* 21,101-127; 1982

**Hauber J.,** Bouvier, M., Malim, M. H., Cullen B. R., *J. Virol* 62:4801-4804; 1988

**Heriche, J.-K.,** Lebrin, F., Rabilloud, T., Leroy, D., Chambaz, E. M., Goldberg, Y. *Science* 276:952-955; 1997

**Hilt, W.,** Wolf, D. H. *Mol. Biol. Rep.* 21:3-10; 1995

**Hochstrasser, M.,** *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:215-223, 1995

**Hoffman, U.,** Hecht, R., Boldyreff, B., Issinger, O-G, *Biochim. Biophys. Acta* 1260:337-340; 1995

**Hrubey, T. W. y** Roach, P. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172:190-196; 1990

**Inoue, A.,** Tei, Y., Hasuma, T. Yukioka, M., Morisawa, S., *FEBS Lett.* 117:68-72; 1980

**Issinger, O. G.,** Benne, R., Hershey, J.W.B., Traut, R.R., *J. Biol. Chem.* 251:6471-6474; 1976

**Jakobi, R.,** Traugh, J. A., *Eur. J. Biochem.* 230: 1111-1117; 1995

**Jakobi, R.,** Traugh, J. A., *J. Biol. Chem.* 267:23894-23902; 1992

**Jones, M. E. E.,** Haire, M. F., Kloetzel, P. M., Mykles, D. L., Schwartz, L. M., *Manduca sexta, Dev. Biol.* 169:436-447; 1995

**Kimura, K.,** Nozaki, N., Enomoto, T., Tanaka, M., Kikuchi, A., *J. Biol. Chem.* 271:21439-21445; 1996

**Kimura, L.,** Pearsall, N. *Infect. Immun.* 21:64-68; 1978

**Krebs, E. G. y** Fischer, E. H., *Biochim. Biophys. Acta* 20:150-157; 1956

**Kubota, K,** Keith, F. J., Gay, N. J., *Biochem. J.* 296:497-503; 1993

**Künzel, W. A., Mulligan, J. A., Sommercorn, J., Krebs, E. G.,** *J. Biol. Chem.* 262:9136-9140; 1987

**Land, G., Mc Donald, W., Stjernholm, R., Friedman, L.** *Infect. Immun.* 12:119-127; 1976

**Leberer, E., Harcus D., Broadbent, I., Clark, K., Dignard, D., Zielgelbauer, K., Schmidt, A., Gow, N., Brown, A., Thomas, D.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:13217-13222; 1996

**Lee J. H., Kim M. S., Lee Y. T., Marshak D. R., Bae Y. S.,** *Biochem Biophys Res Commun* 238:462-467; 1997

**Leroy, D., Valero, E., Filhol, O., Heriché, J.-K., Goldberg, Y., Chambaz, E. M., Cochet, C.,** *Cell. Mol. Biol. Res.* 40:441-453, 1994

**Levene, P. A. y Alsberg, C.,** *Z. Physiol. Chemie* 31:543-555; 1900

**Litchfield, D. W., Arendt, A., Lozeman, F. J., Krebs, E. G. Hargrave, P. A., Palczewski, K.,** *Febs Lett.* 261:117-120; 1990

**Litchfield, D. W., Lozeman, F. J., Cicirelli, M. F., Harrylock, M., Ericsson, L. H., Piening, C. J., Krebs, E. G.,** *J. Biol. Chem.* 266:13706-13711, 1991

**Litchfield, D. W., Slominski, E., Lewenza, S., Narvey, M., Bosc, D. G., Geitz, D. R.,** *Biochem. Cell. Biol.* 74:541-547; 1996

**Liu, H., Kohler, J., Fink, G. R.,** *Science* 266:1723-1725; 1994

**Liu, H., Styles, G., Fink, G. R.,** *Science* 262:1741-1743; 1993

**Livak, K. J.,** *Genetics* 124:303-316; 1990

**Lorenz, P., Pepperkok, R., Ansorge, W., Pyerin, W.,** *J. Biol. Chem.* 268:2733-2740; 1993

**Lozeman, F. J., Lichfield, D.W., Piening, C., Takio, K., Walsh, K.A., Krebs, E. G.,** *Biochemistry* 29:8436-8447; 1990

**Ludemann, R., Lerea, K., Etlinger, J. D.** *J. Biol. Chem.* 268:17413-17417; 1993

**Marchiori, F., Meggio, F., Marin, O., Borin, G., Calderan, A., Ruzza, P., Pinna, L. A.** *Biochim. Biophys. Acta* 971:332-338; 1988

**Maridor, G., Park, W., Krek, W., Nigg, E. A.** *J. Biol. Chem.* 266:2362-2368, 1991

**Marin, O., Meggio, F., Boldyreff, B. Issinger, O. G. Pinna, L. A.,** *Febs Letters* 363:111-114; 1995

**Marin, O., Meggio, F., Marchiori, F., Borin, G., Pinna, L.A.,** *Eur. J. Biochem.* 160:239-244; 1986

**Marin, O., Meggio, F., Pinna, L.A.,** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198:898-905; 1994<sup>a</sup>

**Marin, O., Meggio, F., Sarno, S., Pinna, L.A.,** *Biochemistry*, 36:7192-7198, 1997  
*Biochem.* 223:647-653;

**Marin, O., Meggio, F., Sarno, S., Andretta, M., Pinna, L.A.,** *Eur. J. Biochem.* 223:647-653; 1994b

**Meggio, F, Marin, O., Pinna, L.A.,** *Cell. Mol. Biol. Res.* 40:401-409; 1994b

**Meggio, F, Perich, J.W., Meyer, H. E., Hoffmann-Posorske, E., Lennon, D. P. W., Johns, R. B., Pinna, L. A.** *Eur. J. Biochem.* 186:459-464; 1989

**Meggio, F. , Shugar, D. y Pinna, L. A.,** *Eur. J. Biochem.* 187:89-94, 1990

**Meggio, F. y Pinna, L. A.** *Biochim. Biophys. Acta* 971:227-231; 1988

**Meggio, F., Boldyreff, B., Issinger, O. G., Pinna, L.A.,** *Biochem.* 33:4336-4342; 1994<sup>a</sup>

**Meggio, F., Boldyreff, B., Marin, O., Marchiori, R., Perich, J. W., Issinger, O. G., Pinna, L. A.,** *Eur. J. Biochem.* 205:939-945; 1992

**Meggio, F., Boldyreff, B., Marin, O., Pinna, L.A., Issinger, O. G.** *Eur. J. Biochem.* 204:293-297; 1992

**Meggio, F., Brunati, A. M., Pinna, L.A.,** *Febs Letters* 160, 203-208; 1983

**Meggio, F., Brunati, A. M., Pinna, L.A.,** *Febs Letters* 215, 241-246; 1987

**Meggio, F., Donella-Deana, A., Pinna, L.A.,** *J. Biochem. (Tokio)*86:261-264; 1979

**Meggio, F., Donella-Deana, A., Pinna, L.A.,** *J. Biol. Chem.* 256:11958-11961; 1981

**Meggio, F., Donella-Deana, A., Pinna, L.A.,** *FEBS Lett.* 91:216-221; 1978

**Meggio, F., Perich, J. W., Reynolds, E. C., Pinna, L. A.,** *FEBS Lett.* 279:307-309; 1991

**Meisner, H., Heller-Harrison, R., Buxton, J., Czech, M. P.,** *Biochemistry* 28:4072-4076; 1989

**Mitchell, C., Blaho, J. A., Roizman, B.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11864-11868; 1994

**Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Kamada, H., Shinozaki, K.,** *Plant Mol. Biol.* 21:279-289; 1993

**Mosch, H., Roberts, R. Fink, G.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:5352-5356; 1996

- Mulner-Lorillon, O., Marot, J., Cayla, X., Puhle, R., Belle, R.,** *Eur. J. Biochem.* 171:107-117; 1988
- O'Farrell, P. Z., Goodman, H. M., O'Farrel, P. H.,** *Cell* 12:1133-1142; 1977
- Odds, F. C.** "*Candida and candidosis*", 2da Edición Balliere Tindall, London; 1988
- Odds, F. C.** "*Candida and candidosis*", University Park Press, Baltimore; 1979
- Odds, F. C.** *Am. Soc. Microbiol. News*:60, 313-318; 1994
- Padmanabha, R., Chen-Wu, J. L. P., Hanna, D. E., Glover, C. V. C.,** *Mol. Cell. Biol.* 10:4089-4099; 1990
- Pahl, H. L., Baeuerle, P. A.,** *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:340-347, 1996
- Pardo, P. S., Fernández Murray, P., Walz, K., Franco, L., Passeron, S.** *Arch. Biochem. Biophys. Acta* 1054:267-287; 1998
- Paveto, M. C., Egidy, G., Galvagno, M. A. Passeron, S.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167:1177-1183; 1990
- Paveto, M. C., Mallo, G., Egidy, G., Galvagno, M. A., Passeron, S.** *Cell. Biol. Int. Rep.* 15:169-178; 1991
- Pepperkok, P., Lorenz, P., Jakobi, A., Ansorge, W., Pyerin, W.,** *Exp. Cell. Res.* 197:245-249; 1991
- Perich, J. W., Meggio, F., Reynolds, E. C., Marin, O., Pinna, L. A.,** *Biochemistry* 31:5893-5897; 1992
- Peters, J. M.,** *Trends Biochem. Sci.* 19:377-382; 1994
- Pinna, L. A., Baggio, B., Moret, V., Siliprandi, N.,** *Biochim. Biophys. Acta* 178:199-201; 1969
- Pinna, L. A.,** *Biochim. Biophys. Acta* 1054:267-284; 1990
- Pinna, L. A.,** *Cell. Mol. Biol. Res.* 40:383-390; 1994
- Pinna, L. A., Donella Deana, A., Meggio, F.,** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87:114-120; 1979
- Pinna, L. A., Meggio, F., Dediukina, M.,** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100:449-454; 1981
- Rabinowitz, M. y Lipmann, F.,** *J. Biol. Chem.* 235:1043-1050; 1960
- Renard, M. F., Sastre, L., Sebastian, J.** *Eur. J Biochem.* 140:47-54; 1984

**Rihis, H. P.**, Jans, D. A., Fan, H., Peters, R., *EMBO J.* 10:663-639; 1991

**Roach, P. J.**, *J. Biol. Chem.* 266:14139-14142; 1991

**Rodnight, R.** y Lavin, B. E., *Biochem. J.* 93:84-91; 1964

**Roussou, I.** y Draetta, G., *Mol. Cell. Biol.* 14:576-586; 1994

**Saxena, A.**, Padmanabha, R., Glover, C.V.C., *Mol. Cell. Biol.* 7:3409-3417; 1987

**Seldin, D. C.**, Leder, P., *Science* 267:894-897; 1995

**Siberstein, S.**, Cantore, M. L., Galvagno, M. A., Passeron S., *Arch. Biochem. Biophys.* 282, 132-140; 1990

**Simonetti, N.**, Strippoli. V., Cassone, A. *Nature* 250:344-346; 1974

**Smith, C.** “*Candidiosis*” Raven Press, New York, pp53-70; 1985

**Snell, V.**, Nurse, P., *EMBO J.* 13:2066-2074; 1994

**Stewart, P.**, Rogers, P. “*The filamentous Fungi*” vol.3 chap9 Smith y Berry Eds. pp465; 1978

**Stoldt, V. R.**, Sonneborn, A., Leuker, C. E., Ernst, J. F., *EMBO J.* 16:1862-1866; 1997

**Swarson, R.**, Alex, L., Simon, M., *Trends Biochem. Sci.* 19:485-490; 1994

**Takio, K.**, Kuenzel, E.A., Walsh, K.A., Krebs, E.G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4851-4855; 1987

**Taylor, S. S.**, Knighton, D. R., Zheng, J., Sowadski, J. M. Gibbs, C. S., Zoller, M. J., *Trends Biochem. Sci.* 18:84-89; 1993

**Thornburg W.**, y Lindell T. J., *J. Biol. Chem.* 252:6660-6665; 1977

**Traugh, J. A.**, Tahara, S. M., Sharp, S. B. Safer, B., Merrick, W. C. *Nature* 263:163-165; 1976

**Tuazon, P. T.**, Bingham, E. W., Traugh, J. A., *Eur. J. Biochem.* 94:497-504; 1979

**Tuazon, P. T.**, Traugh, J. A., *Advances in second messenger and phosphoprotein research*, vol. 23:123-164 New York: Raven Press; 1991

**Ulloa, L.**, Diaz-Nido, J., Avila, J. *EMBO J.* 12:1633-1640; 1993

**Umeda, M.**, Manabe, Y., Uchimiya, H., *FEBS Lett.* 403:313-317; 1997

**Umezawa, H.** y Aoyagi, T. *in Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*, 2<sup>nd</sup> ed., A. J. Barret, Cambridge, 1979

- Van Rij., K. N. J. W.** “*The yeasts a taxonomic study*” 3ra Edición Groninagen, The Netherlands, pp1082; 1984
- Villar-Palasi, C. y Kumon, A.** *J. Biol. Chem.* 256:7409-7415; 1981
- Wada T., Takagi T., Yamaguchi Y., Kawase H., Hiramoto M., Ferdous A., Takayama M., Lee K. A. W., Hurst H. C., Handa H.,** *Nucleic Acids Research*, 24:876-884; 1996
- Wehren, A., Meyer, H. E., Sobek, A., Kloetzel, P. M., dahlmann, B.** *Biol. Chem.* 377:497-503; 1996
- Wilson, L. K., Dhillon, N., Thorner, J. y Martin, G. S.,** *J. Biol. Chem.* 272:12961-12967; 1997
- Yan, T-F. J., Tao, M.,** *J. Biol. Chem.* 257:7037-7043; 1982
- Zelada, A., Castilla, R., Passeron, S., Cantore, M. L.** *Cell. and Mol. Biol.* 42:567-576; 1996
- Zwickl, P., Grziwa, A., Puhler, G., Dahlmann, B., Lottspeich, F., Baumeister, W.,** *Biochemistry* 31:964-972; 1992

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Luis Villar-Palasi', written in a cursive style.