

Tesis de Posgrado

Morfogénesis y cAMP en el hongo *Mucor rouxii*

Pereyra, Elba Nora

1999

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

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

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pereyra, Elba Nora. (1999). Morfogénesis y cAMP en el hongo *Mucor rouxii*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3105_Pereyra.pdf

Cita tipo Chicago:

Pereyra, Elba Nora. "Morfogénesis y cAMP en el hongo *Mucor rouxii*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3105_Pereyra.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCE y N BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Morfogénesis y cAMP en el hongo *Mucor rouxii*

Autor : Elba Nora Pereyra

Director : Silvia Moreno de Colonna

Lugar de trabajo : Departamento de Química Biológica

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

1999

2105



UNIVERSITY OF BUENOS AIRES
FACULTY OF EXACT AND NATURAL SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL CHEMISTRY

**Morphogenesis and cAMP
in the fungus *Mucor rouxii***

Author : Elba Nora Pereyra
Supervisor: Silvia Moreno de Colonna

Ph.D. Thesis

1999

A Ricardo

A Daniel y Francisco

A mamá

*Si un hombre no marcha al paso de sus acompañantes
quizás sea porque escucha un tambor diferente.*

Thoreau

AGRADECIMIENTOS

A Silvia, por haberme mirado con su mirada azul, que siempre ve lo esencial, y por haberme guiado todos estos años con cariño y paciencia infinitos.

A Singungui, por darme un lugar en su gran corazón y por su aguda percepción.

A Vani, por su simpatía y dulzura capaces de calmar mis tormentas.

A Cynthia, por permitirme crecer a su lado, cuando ella crecía.

A María Rosa, por la agradable compañía de los últimos tiempos.

A Clau, por los primeros tiempos y por recordarme que las distancias no siempre separan.

A Ruth, por su cariño y apoyo incondicionales e indispensables.

A todas, por aceptarme tal como soy.

RESUMEN

- El dibutilil - cAMP y los análogos de cAMP específicos para el sitio 2 de la subunidad regulatoria de la proteína quinasa A inhiben el crecimiento polarizado en el hongo *Mucor rouxii* en forma dosis dependiente, sin alterar los parámetros de crecimiento.

- Este efecto se observa en todas las condiciones nutricionales o ambientales ensayada; puede lograrse también con inhibidores de la fosfodiesterasa de alta afinidad para cAMP. El efecto es reversible.

- Los resultados experimentales sugieren que la proteína quinasa A está involucrada en esta inhibición y que la especificidad de los compuestos para producirla depende de las altas concentraciones enzimáticas presentes en los sistemas vivos.

- Se postula la necesidad de una actividad específica crítica de la proteína quinasa A, la cual debe ser alcanzada por las células para germinar.

- El tratamiento con inhibidores de los microfilamentos produce las mismas alteraciones morfológicas, observadas al microscopio óptico, que los análogos de cAMP.

- El análisis por microscopía electrónica de la ultraestructura de la pared celular revela que presenta alteraciones e irregularidades.

- Estas alteraciones son similares a los efectos producidos por tratamiento con inhibidores de la polimerización de actina en hongos de especies relacionadas (datos de la literatura). Estas observaciones sugieren que la proteína quinasa A podría actuar a través de un mecanismo que involucre al citoesqueleto de actina.

Palabras claves : transducción de señales - cAMP - proteína quinasa A - morfogénesis - *Mucor rouxii* - actina

SUMMARY

- Dibutyryl-cAMP and cAMP analogs, site-2 selective for the regulatory subunit of protein kinase A impair polarized growth of the fungus *Mucor rouxii* in a dose dependent manner, without altering growth parameters.

- The effect is observed under all the nutritional or ambient conditions of growth assayed ; it can also be observed when using high affinity cAMP phosphodiesterase inhibitors. The effect is reversible.

- The experimental results presented suggest that protein kinase A is involved in this inhibition and that the specificity of the cAMP analogs to promote this effect is related to the high concentration of enzyme present within the cell.

- A proposal is presented that states that a critical specific activity of protein kinase A must be attained in order for the cell to emit the germ tube.

- Treatment of the cells with microfilament inhibitors, produces the same effects, as observed by the light microscope, as the one obtained with cAMP analogs.

- Electronic microscopic analysis of the cell wall ultrastructure indicates alterations in its structure..

- This alterations resemble the ones described in the literature to be produced in other fungi, when incubated in the presence of inhibitors of actin microfilaments. These observations suggest that the actin cytoskeleton could be involved in the effect of protein kinase A in cell morphology.

Key words : signal transduction - cAMP - protein kinasa A - morphogenesis - *Mucor rouxii* - actin

INDICE GENERAL

INTRODUCCION

OBJETIVO	2
TRANSDUCCION DE SEÑALES POR cAMP	3
QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE cAMP	7
SUBUNIDAD CATALITICA	8
SUBUNIDAD REGULATORIA	11
ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LA PKA	14
CONTROL DE LA SINTESIS Y DE LA DEGRADACION DE LAS SUBUNIDADES DE LA PKA	19
QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE cAMP DE <i>MUCOR ROUXII</i>	20
EFFECTOS DEL cAMP MEDIADOS POR LA PKA	22
DIFERENCIACION MEDIADA POR PKA EN EUCARIONTES SUPERIORES	23
DIFERENCIACION MEDIADA POR PKA EN HONGOS	24
MORFOGENESIS EN <i>MUCOR ROUXII</i>	26
COMPOSICION Y CONSTRUCCION DE LA PARED CELULAR	28
EL CITOESQUELETO Y SU ROL EN LA MORFOGENESIS	31
MODELOS DE MORFOGENESIS EN HIFAS	33
FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA MORFOGENESIS	35
<i>MUCOR ROUXII</i> COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA MORFOGENESIS	37

MATERIALES Y METODOS

PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	41
ORGANISMO UTILIZADO	41
OBTENCION DE ESPORAS Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA	41

CULTIVOS	41
PREPARACION DE CELULAS PERMEABILIZADAS	41
OBTENCION DE PAREDES	42
DETERMINACION DE PARAMETROS DE CRECIMIENTO	42
PESO SECO	42
PROTEINAS	43
DNA	43
OBSERVACIONES MICROSCOPICAS	43
MICROSCOPIA OPTICA	43
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	44
Tinción de núcleos con DAPI	44
Tinción de F-actina con FITC-faloidina	44
Tinción de células con FITC-concanavalina A	44
MICROSCOPIA ELECTRONICA	45
Fijación	45
Postfijación con tetróxido de osmio	46
Tratamiento con metaperiodato	46
Tratamiento con cloruro de amonio	46
Inclusión en agar	47
Deshidratación	47
Inclusión en la resina	47
Tratamiento con uranilo y citrato de plomo	47
Observación de los preparados	47
PREPARACIONES ENZIMATICAS	48
PREPARACIONES DE EXTRACTOS CRUDOS PARA MEDICION DE PKA	48
PREPARACION DE PKA PARCIALMENTE PURIFICADA	48
PREPARACION DE PKA POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA	49
PREPARACION DE PDE PARCIALMENTE PURIFICADA	49
ENSAYOS ENZIMATICOS	50
ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE PKA	50

Medición de actividad de holoenzima proveniente de extractos crudos	50
Medición de actividad de holoenzima parcialmente purificada	50
Medición de actividad de holoenzima en células permeabilizadas	51
MEDICION DE ACTIVIDAD LIGANTE DE cAMP	51
MEDICION DE ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA	51
OTRAS DETERMINACIONES	52
DETERMINACION DEL CONTENIDO DE cAMP	52
Obtención de las muestras	52
Purificación del cAMP	52
Dosaje del cAMP	53
DETERMINACION DE PROTEINAS	53
OTRAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS	53
Peroxidasa	53
Catalasa	53
Citocromo C	53
MEDICION DE LA RADIOACTIVIDAD	54
Radiación beta	54
Radiación gamma	54
BUFFERS	54
REACTIVOS	55

RESULTADOS Y DISCUSION

EFFECTO DEL DIBUTIRIL cAMP SOBRE MORFOLOGIA Y CRECIMIENTO	58
EFECTOS SOBRE MORFOLOGIA	58
CURVAS DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE dbcAMP	60
EFFECTO DEL dbcAMP SOBRE EL NUMERO DE NUCLEOS, EL CONTENIDO DE DNA Y PROTEINAS DE LA CELULA	63

NIVELES DE cAMP INTRA Y EXTRACELULARES EN PRESENCIA DE dbcAMP	66
ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS ALTERACIONES MORFOLOGICAS PROVOCADAS POR EL dbcAMP	66
DISCUSION	68
EFFECTO DE COMPUESTOS QUE AFECTAN LA VIA DE TRANSDUCCION DE SEÑALES POR cAMP SOBRE LA MORFOLOGIA	70
EFFECTO DE ANALOGOS SITIO ESPECIFICOS SOBRE LA MORFOLOGIA	70
Activación de la PKA por análogos de cAMP sitio especificos	74
EFFECTO DE INHIBIDORES DE PDE SOBRE MORFOLOGIA	74
EFFECTO DEL TIEMPO DE AGREGADO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA MORFOLOGIA	76
EFFECTO DE ANALOGOS DE cAMP Y DEL SQ 65,442 SOBRE LA MORFOLOGIA, BAJO DIFERENTES CONDICIONES NUTRICIONALES Y AMBIENTALES	80
DISCUSION	82
ACTIVIDAD DE PKA Y DIFERENCIACION	84
CONSIDERACIONES EXPERIMENTALES DE MEDICION DE C Y R	84
NIVELES DE PKA BAJO DIFERENTES CONDICIONES NUTRICIONALES	86
Hipótesis de la necesidad de una actividad "crítica" de PKA	88
ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS SUBUNIDADES DE PKA EN ESPORAS CULTIVADAS EN PRESENCIA DE ANALOGOS DE cAMP	93
ACTIVIDAD ESPECIFICA DE C DURANTE LA REVERSION DEL EFFECTO DEL dbcAMP	93
ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS SUBUNIDADES DE PKA CUANDO SE AGREGA EL dbcAMP LUEGO DE LA EMISION DEL TUBO GERMINATIVO	96

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS SUBUNIDADES DE PKA EN ESPORAS CULTIVADAS EN PRESENCIA DE SQ 65,442	96
ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS SUBUNIDADES DE PKA EN ESPORAS CULTIVADAS EN MEDIO RICO CON dbcAMP O SQ 65,442	99
EFFECTO DE INHIBIDORES DE PKA SOBRE MORFOLOGIA ANALISIS DE LA HOLOENZIMA Y LA SUBUNIDAD R A TRAVES DE GRADIENTES DE SACAROSA	104
DISCUSION	108
EFFECTO DE ANALOGOS DE cAMP SOBRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y LA PARED CELULAR DE <i>MUCOR ROUXII</i>	116
EFFECTO DE CITOCALASINA A SOBRE MORFOLOGIA	116
EFFECTO DE LOS ANALOGOS DE cAMP SOBRE LA POLIMERIZACION DE ACTINA	117
ULTRAESTRUCTURA DE LA PARED DE <i>MUCOR ROUXII</i>	119
EFFECTO DE LOS ANALOGOS DE cAMP SOBRE LA DISTRIBUCION DE MANOPROTEINAS EN LA PARED DE <i>MUCOR ROUXII</i>	126
DISCUSION	128

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES	132
--------------	-----

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS	136
--------------	-----

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA	142
--------------	-----

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCION

Figura 1. Regulación de las adenilato ciclasas	4
Figura 2. Subunidad catalítica de PKA. Estructura de dominios	9
Figura 3. Subunidad regulatoria de PKA. Estructura de dominios	12
Figura 4. Sustratos de PKA que se encuentran en mayor concentración en las células	17
Figura 5. Ultraestructura de pared de <i>Mucor rouxii</i>	29

RESULTADOS Y DISCUSION

Figura 1. Morfología de <i>Mucor rouxii</i> bajo diferentes condiciones de cultivo	59
Tabla 1. Efecto de concentraciones variables de dbcAMP sobre crecimiento y morfología	61
Figura 2. Curvas de crecimiento de <i>Mucor rouxii</i> en DMG	62
Tabla 2. Número de núcleos en ausencia y en presencia de 150 μ M dbcAMP	64
Tabla 3. Contenido de proteínas y DNA en cultivos +/- dbcAMP	65
Tabla 4. Niveles intra y extracelulares de cAMP	67
Tabla 5. Efecto de análogos de cAMP sobre morfología	72
Tabla 6. Parámetros de los análogos de cAMP.	73
Figura 3. Curvas de activación de PKA por análogos de cAMP a diferentes concentraciones de enzima	75
Tabla 7. Efecto de inhibidores de PDE sobre morfología	77
Figura 4. Efecto de inhibidores de PDE sobre morfología	78
Figura 5. Agregado de análogos de cAMP a distintos tiempos durante la germinación	79
Tabla 8. Efecto morfológico bajo diferentes condiciones ambientales y nutricionales	81
Tabla 9. Medio de cultivo y parámetros celulares al momento de la emisión del tubo germinativo	87
Figura 6. Actividad específica de PKA y peso seco durante la germinación	89

Figura 7. Niveles y actividad específica de PKA bajo diferentes condiciones nutricionales, en el momento de la emisión del tubo germinativo	90
Tabla 10. Un cambio en el medio de cultivo afecta el tiempo de emisión del tubo germinativo y la sensibilidad al cAMP	92
Figura 8. Actividad específica de las subunidades catalítica y regulatoria de PKA y cocientes R/C para los diferentes análogos de cAMP	94
Figura 9. Actividad específica de C durante la reversión del efecto del dbcAMP	95
Figura 10. Actividad específica de las subunidades catalítica y regulatoria de PKA y cocientes R/C . Agregado de dbcAMP en diferentes momentos de la germinación	97
Figura 11. Actividad específica de las subunidades catalítica y regulatoria de PKA y cocientes R/C. Efecto del SQ 65,442	98
Figura 12. Actividad específica de las subunidades catalítica y regulatoria de PKA y cocientes R/C. Efecto del dbcAMP en medio YPG	100
Figura 13. Actividad específica de las subunidades catalítica y regulatoria de PKA y cocientes R/C. Efecto del SQ 65,442 en medio YPG	101
Tabla 11. Efecto de inhibidores de PKA sobre morfología	102
Figura 14. Sedimentación en gradientes de sacarosa de extractos obtenidos a 12 hs de cultivo	105
Figura 15. Sedimentación en gradientes de sacarosa de extractos obtenidos a 20 hs de cultivo	107
Figura 16. Actividad específica de la subunidad catalítica de PKA. Cromatografía en DEAE-Sepharosa de extractos obtenidos a 20 hs de cultivo	109
Figura 17. Efecto de citocalasina A sobre morfología	118
Figura 18. Microscopía de fluorescencia. Tinción con FITC-faloidina	120
Figura 19. Microscopía óptica. Imagen de una célula cultivada 30 hs en DMG, inóculo 1×10^5 con dbcAMP $300 \mu\text{M}$	121
Figura 20. Ultraestructura de la pared celular en células enteras	122
Tabla 12. Ultraestructura de la pared . Análisis morfométrico	124
Figura 21. Ultraestructura de la pared celular en preparaciones de paredes aisladas	125

Figura 22. Microscopía de fluorescencia .Tinción con FITC-Con A	127
Figura 23. Ultraestructura de la pared celular en <i>Mucor mucedo</i> y <i>Mucor rouxii</i>	130

PERSPECTIVAS

Figura 1. Regulación de la actividad de Rho A	137
Figura 2. Formación de las fibras de stress de microfilamentos de actina inducidas por Rho A	138

INTRODUCCION

OBJETIVO

En el sistema de transducción de señales por cAMP el componente principal de la cascada es la quinasa de proteínas dependiente de cAMP, la cual media las acciones de ese nucleótido cíclico a través de la fosforilación de proteínas.

El objetivo general de nuestro grupo de investigación es dilucidar los mecanismos de activación de la PKA y la forma en que ésta media la transducción de la señal de cAMP.

Uno de los modelos utilizados para este estudio es el hongo *Mucor rouxii*, en el cual ya se ha caracterizado desde el punto de vista bioquímico a la PKA, así como a las enzimas responsables de su síntesis y degradación.

Para poder estudiar la transducción de cAMP mediada por PKA sería importante encontrar parámetros morfológicos medibles *in vivo* que fueran consecuencia directa de la actividad de la PKA, de modo de poder observar diferencias morfológicas durante el desarrollo de las estructuras fúngicas al alterar la actividad de la enzima.

El objetivo de esta tesis doctoral ha sido estudiar el rol de la PKA en la emisión del tubo germinativo, durante la germinación aeróbica del hongo *Mucor rouxii*.

TRANSDUCCION DE SEÑALES POR cAMP

La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo clave en la regulación de las células eucariontes. La primera demostración de que la fosforilación regulaba la actividad de una enzima se realizó en la glucógeno fosforilasa en respuesta a glucagon (Fischer y Krebs, 1955; Sutherland y Wosilait, 1955,). El paso siguiente fue la identificación de un factor termoestable que mediaba el efecto del glucagon : el 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (cAMP) (Sutherland y Rall, 1958). Así comenzó a desarrollarse el concepto de que el cAMP era un segundo mensajero intracelular en un amplio rango de caminos de señalización celular (Robison *et al.*, 1971; Botsford, 1981; Pall, 1981).

En células procariotas este nucleótido cíclico estimula la transcripción de varios operones por unión a una proteína denominada CAP (catabolite gene activator protein) o CRP (cAMP receptor protein) (Shabb y Corbin, 1992). En eucariotas en cambio, el cAMP no está involucrado en la estimulación directa de la transcripción sino que tiene un rol de segundo mensajero

La generación de cAMP es catalizada por la enzima denominada adenilato ciclasa (AC), en respuesta a una variedad de señales extracelulares vía la acción de una cascada asociada a membrana. En eucariotas superiores los intermediarios en este camino de señalización son las proteínas G, las cuales son heterotrimeros compuestos por una subunidad alfa que une GTP/GDP, y un complejo formado por las subunidades beta y gamma que se encuentran asociadas.

En un esquema general, cuando un receptor es activado por una hormona u otro ligando modula la actividad de la proteína G, la cual interactúa con la AC regulando así la velocidad de síntesis del cAMP (Gilman, 1987).

La estimulación de la AC se realiza a través de la subunidad alfa de la proteína G estimuladora G_s . La inhibición de la AC es más compleja ya que existen regulaciones inhibitorias específicas en las que intervienen otras subunidades de G como la $G_{i\alpha}$ y el complejo beta-gamma (Gilman, 1987; Taussig y Gilman, 1995).

Se han identificado y descrito varias isoformas de AC. En mamíferos la mayoría de éstas está asociada a la membrana plasmática (Tang y Gilman, 1992), (Fig. 1A); también se detectó actividad de AC en bacterias (Tao y Lipmann, 1969; Ladant, 1988; Bianchini *et al.*, 1990; Hidaka *et al.*, 1979), hongos (Kachatrian *et al.*, 1987; Katoaka *et*

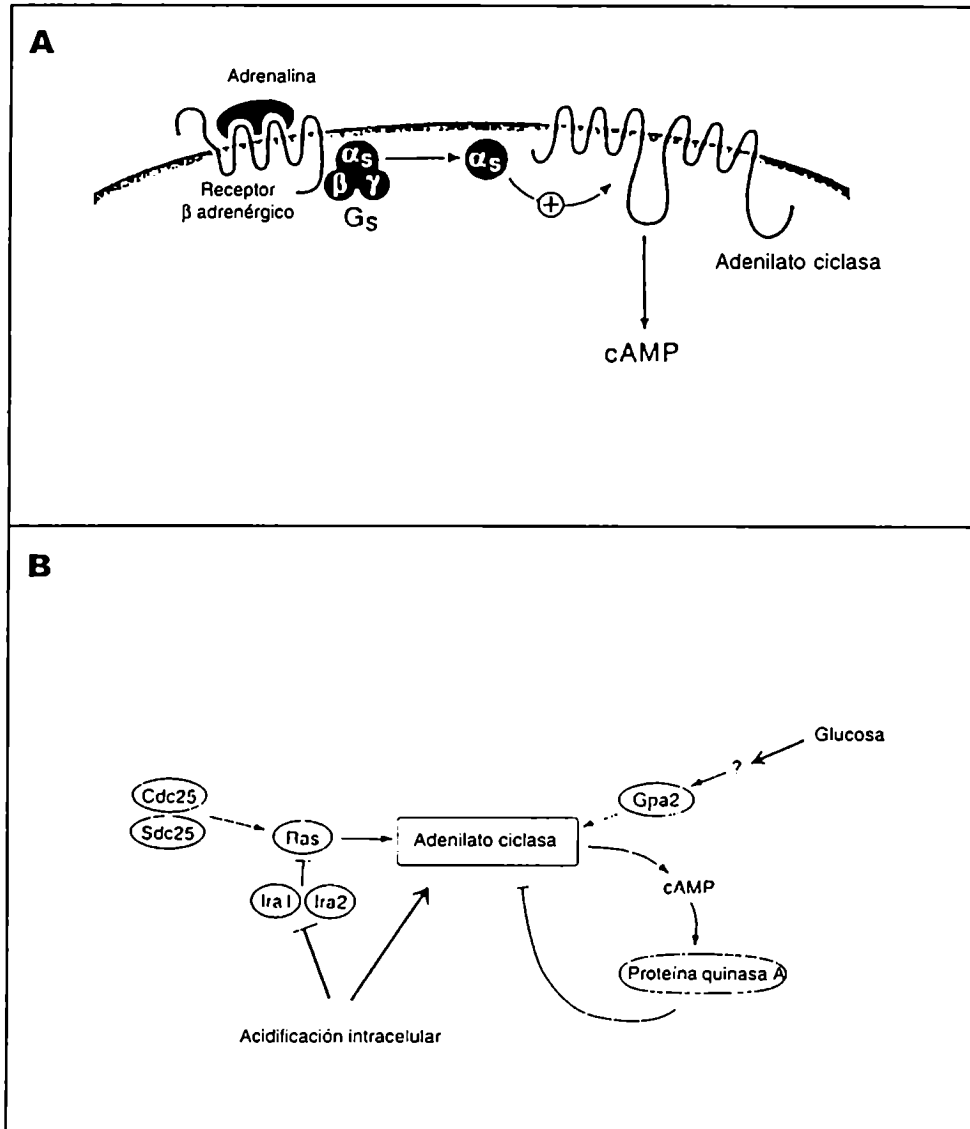


Figura 1- A- Regulación de las adenilato ciclasas de eucariontes superiores. Activación ligando-específica del receptor beta adrenérgico asociado a una proteína G estimuladora. **B- Regulación de las adenilato ciclasas de eucariontes inferiores.** Activación por acidificación intracelular de la vía de transducción de señales por RAS y activación de una proteína G α estimuladora (Gpa2) por glucosa. Regulación negativa de la adenilato ciclasa por PKA.

al., 1985; Flawiá y Torres, 1972a y b; Cantore *et al.*, 1980), protozoarios (Torruella *et al.*, 1986; Coso, 1993) y plantas (Carricarte *et al.*, 1988).

En *Saccharomyces cerevisiae* la AC puede ser regulada tanto por una proteína G como por una proteína monomérica que une GTP llamada RAS. La activación de la AC por RAS depende de la acidificación intracelular; mientras que la regulación de AC por la proteína G depende de la activación inducida por glucosa (Colombo *et al.*, 1998). En la Fig. 1B puede observarse un esquema que ilustra ambas vías de transducción de señales.

El cAMP sintetizado por la AC se libera de la membrana y difunde en la célula. Los procesos controlados por este nucleótido en sistemas eucariotas son mediados principalmente por la PKA. Se ha demostrado que algunas hormonas que actúan sobre la PKA, son capaces de mediar la distribución de cAMP en la célula, creando zonas compartimentalizadas de concentración de este nucleótido (Harper *et al.*, 1985). La acumulación compartimentalizada del cAMP, resulta en la activación selectiva de una isoforma particular de PKA, la cual a su vez también se encuentra compartimentalizada en sitios determinados a través de su anclaje a proteínas específicas, permitiéndose una rápida y preferencial fosforilación de un sustrato (Scott y McCartney, 1994). Esta quinasa al igual que las demás quinastas de proteínas, modifica la actividad de sus proteínas blanco por fosforilación, generando así una amplia variedad de respuestas.

La fosforilación de proteínas es un mecanismo rápido, reversible y covalente, por medio del cual la célula puede alterar la actividad de proteínas específicas en respuesta a señales extracelulares o intracelulares, las cuales tienen la función de controlar rápidamente una variedad de procesos celulares. Los blancos fosforilables pueden ser proteínas estructurales y regulatorias (Cohen, 1992; Shenolikar, 1987); a veces una simple fosforilación puede actuar como interruptor de la cascada regulatoria mientras que otras veces la respuesta global se produce por acumulación de fosforilaciones sucesivas.

Se ha observado la colocación de quinastas y fosfatasas dada por asociación a la misma proteína de anclaje, postulándose la existencia de complejos de transducción de señales (Scott, 1997).

Para terminar este proceso de transducción de señales, existen por lo menos dos mecanismos conocidos, que son la hidrólisis del segundo mensajero, que es llevada a cabo por las fosfodiesterasas para el nucleótido cíclico y la regulación de la señal a nivel

del receptor, ya sea por fosforilación que lo insensibilice a la estimulación ulterior, o por internalización del mismo receptor que lo haga inaccesible al agonista. Se han hallado múltiples formas de fosfodiesterasas en eucariotas superiores (Beavo *et al.*, 1995), plantas (Shimoyama *et al.*, 1971), bacterias (Appleman *et al.*, 1973), hongos (Londesborough y Suoranta, 1988; Maia y Camargo, 1974; Galvagno *et al.*, 1979) y protozoarios (Ulloa, 1988). Las formas difieren en cantidad, localización subcelular, afinidad y especificidad por los sustratos, respuesta a efectores y mecanismos de regulación. También se ha descrito el eflujo de cAMP en diferentes sistemas eucariotas superiores y en células de metazoos (Barber y Butcher, 1983), posiblemente mediante alguna forma de transporte activo (Rosenberg, 1992). Se desconoce la importancia de este mecanismo en el apagado de la señal intracelular.

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

Los eucariotas inferiores responden a señales nutricionales del ambiente mediante cascadas de transducción analogables a las que son disparadas por señales extracelulares en eucariotas superiores.

A pesar de haberse demostrado el rol del cAMP como segundo mensajero en eucariotas inferiores, se conoce poco sobre las primeras etapas que llevan al aumento intracelular del nucleótido cíclico. Al igual que en eucariotas superiores, la gran mayoría de las acciones desencadenadas por cAMP están mediadas por la PKA (Thevelein, 1994).

Una de las pocas excepciones conocidas en la que una respuesta a cAMP no está mediada directamente por la PKA son los receptores de cAMP en *Dictyostelium discoideum*. Este hongo posee una familia de receptores (CAR1, CAR2, CAR3 y CAR4) que atraviesan la membrana plasmática, los cuales son capaces de unir cAMP, de acoplarse a una proteína G y sensor de este modo los cambios en el nivel de cAMP extracelular; son importantes en el control del desarrollo (Gross, 1994; Kim *et al.*, 1996).

Se han descrito dos actividades ligantes de cAMP en *Saccharomyces cerevisiae*, diferentes de la subunidad regulatoria de la PKA. Estas proteínas fueron identificadas en vesículas de membranas plasmáticas de *S. cerevisiae*, incluso en

mutantes que presentan una interrupción del gen *bcy1* que codifica para la subunidad reguladora de PKA (Muller y Bandlow, 1991). Sin embargo, aunque ya ha sido secuenciado todo el genoma de *S. cerevisiae*, dichas proteínas no han sido asociadas con ningún gen particular.

Cientos de quinasas de proteínas y fosfatasas controlan un amplio rango de procesos celulares tales como división, señalización, diferenciación y metabolismo. En muchos casos una sola enzima está involucrada en la regulación de múltiples procesos diferentes. El mecanismo por el cual estas enzimas seleccionan el sustrato correcto en el momento adecuado no está aún dilucidado. Un factor involucrado en la elección del sustrato es la misma estructura del sustrato, otro factor importante en esto es la distribución celular de las actividades quinasa y fosfatasa. Recientemente se ha demostrado que las quinasas y las fosfatasas están ubicadas en compartimientos específicos y son translocadas dinámicamente durante los eventos celulares (Inagaki *et al.*, 1994).

QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE cAMP

La mayoría de las enzimas, incluyendo aquellas que juegan un rol regulatorio fundamental catalizan una única reacción. Aquellas enzimas que catalizan múltiples reacciones tienen un nivel más alto de complejidad tanto en su regulación como en la capacidad de interconectar diferentes rutas de transducción de señales.

El grupo mayoritario de las enzimas multisustrato está representado por las quinasas de proteínas, de las cuales la quinasa de proteínas dependiente de cAMP (PKA) es el modelo prototípico (Walsh y Van Patten, 1994)

La PKA (EC 2.7.1.37) purificada en 1968 por Walsh, cataliza la transferencia del grupo fosfato de la posición gamma del ATP a una serina y con menos frecuencia a una treonina de sus sustratos específicos (Taylor y Radzio-Andzelm, 1994; Francis y Corbin, 1994).

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

La PKA es un tetrámero formado por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C). La subunidad regulatoria posee dos sitios de unión de cAMP; la unión de este nucleótido a la R altera su afinidad por la subunidad C y promueve la disociación de esta enzima en un dímero de subunidad regulatoria y dos subunidades catalíticas monoméricas activas (Beebe y Corbin, 1986).

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

SUBUNIDAD CATALITICA

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

Se han identificado tres formas de subunidad catalítica en tejidos de mamíferos C_{α} , C_{β} y C_{γ} . La isoforma C_{α} se expresa constitutivamente en la mayoría de las células, mientras que la C_{β} es tejido específica (Showers y Mauers, 1986, Hedin *et al.*, 1989). La tercer isoforma de subunidad catalítica C_{γ} ha sido detectada en muy pocos tejidos y tiene diferente especificidad de sustratos que C_{α} y C_{β} (Walsh y Van Patten, 1994).

En levaduras existen tres isoformas de C: TPK_1 , TPK_2 , y TPK_3 (Toda *et al.*, 1987a). Estas subunidades catalíticas poseen especificidad de sustrato que se superpone, ya que se vió por medio de experimentos de interrupción de genes, que es sólo necesario uno de los tres genes en la función celular (Toda *et al.*, 1987b).

La subunidad catalítica (Fig.2) contiene una región de aproximadamente 250 aminoácidos, común a todas las proteína quinasas, zona que es conocida como núcleo catalítico (Hanks *et al.*, 1988). Esta región está comprendida entre los residuos 40 a 285 y está compuesta de varias secuencias conservadas; así se pueden identificar residuos y regiones que son esenciales para la actividad catalítica, para la unión de ATP-Mg y unión del sustrato. La enzima consiste en dos "lóbulos", uno pequeño de unión de ATP-Mg y uno mayor asociado con el reconocimiento del sustrato peptídico y la actividad catalítica.

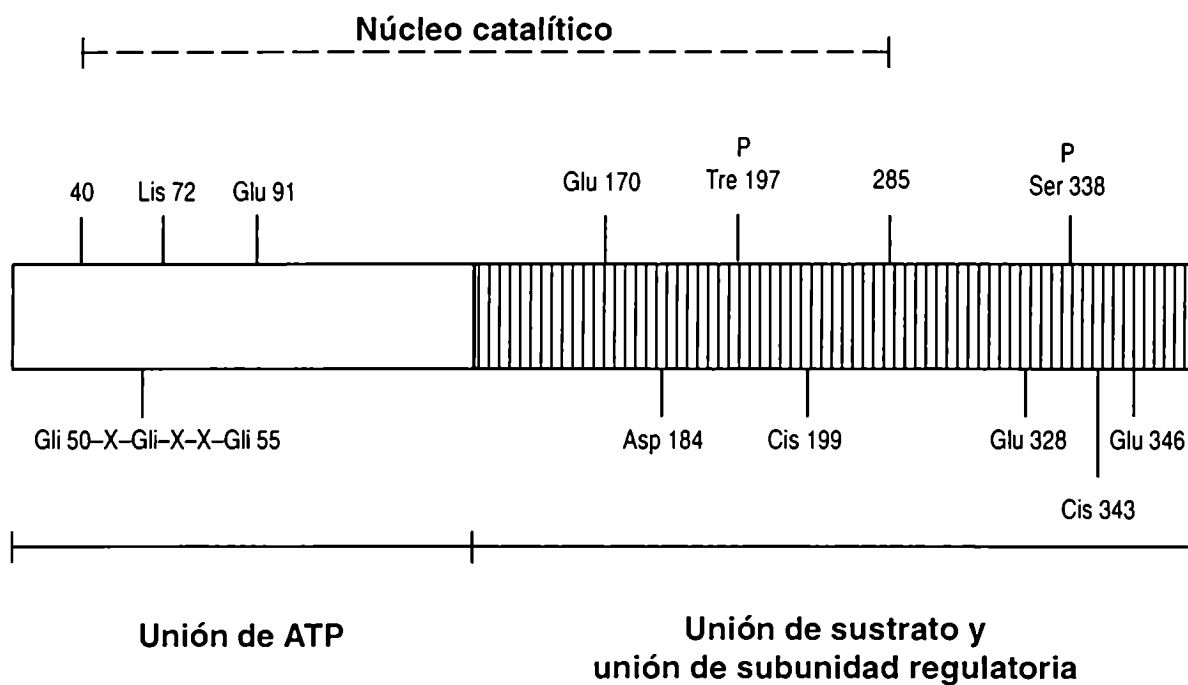


Figura 2- Subunidad catalítica de PKA. Estructura de dominios.

Para que ocurra la catálisis, la subunidad catalítica debe unir el sustrato peptídico y un segundo sustrato que es el ATP. Estos se unen con alta afinidad a sitios diferentes en la subunidad catalítica. El ATP se une en un sitio ubicado en la porción amino terminal de la C. En este sitio se identificó a la Lisina 72, como residuo importante haciendo mutagénesis y modificaciones químicas (Zoller y Taylor, 1979).

El núcleo catalítico de todas las proteínas quinasas contiene una lisina o arginina invariable que corresponde al residuo 72 y que interactúa con el fosfato χ del ATP (Zoller y Taylor, 1979).

También participan adicionalmente de la unión de ATP grupos carboxilo; estos grupos unen Mg^{++} , formando un complejo ternario con el Mg-ATP (Granot *et al.*, 1980); se identificaron dos grupos carboxilo reactivos, aspártico 184 y glutámico 91 (Buechler y Taylor, 1988).

La subunidad catalítica reconoce como sustratos, péptidos que contienen dos aminoácidos básicos separados por uno o dos residuos de la serina o treonina que es fosforilada. La actividad catalítica consiste en la transferencia de un grupo fosfato del ATP a la serina o treonina de la cadena polipeptídica. Grupos carboxilo participan en el reconocimiento y transferencia de fosfato al sustrato peptídico, se cree que es por unión con los residuos básicos del sustrato. Se demostró que el glutámico 170 y un grupo de varios residuos ácidos que se encuentra en el extremo carboxilo-terminal de la molécula, participarían en el reconocimiento del sustrato (Buechler y Taylor, 1990); así como la cisteína 199, el glutámico 346 y la treonina 197 (Mosbashery y Taylor, 1988).

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

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

La fosforilación de la subunidad C ocurre en la treonina 197 y la serina 338 (Shoji *et al.*, 1983). El rol de la fosforilación en Ser-338 aún no está claro, sin embargo la fosforilación en la treonina 197 es importante para la interacción con la subunidad R (Levin y Zoller, 1990), y recientemente se ha demostrado que esta fosforilación sería el resultado de la autofosforilación y que sería un paso crítico para la activación de la subunidad C (Steinberg *et al.*, 1993).

SUBUNIDAD REGULATORIA

La función principal de la subunidad regulatoria es la de inhibir a la subunidad catalítica, en ausencia de cAMP. En eucariotas superiores existen dos tipos de subunidades regulatorias, tipo I y tipo II, que se distinguen por su orden de elución en DEAE-celulosa (Corbin *et al.*, 1975). Muestran distinto peso molecular, distinta secuencia de aminoácidos, estado de fosforilación y localización subcelular.

En cuanto a su estado de fosforilación, la RII puede ser fosforilada por la subunidad catalítica mientras que la RI no (Rosen y Erlichman, 1975; Hoffman *et al.*, 1975). Se han clonado isoformas de cada tipo de R, RI_α (Lee *et al.*, 1983), RII_α (Scott *et al.*, 1987), que son expresadas en la mayoría de los tipos celulares, aunque varían las proporciones relativas de cada una; por otro lado se ha encontrado que RI_β (Clegg *et al.*, 1988) y RII_β (Jahnsen *et al.*, 1988), son más específicas de tejido. Además la expresión de algunas isoformas parece ser constitutiva y la expresión de otras inducible.

La subunidad regulatoria es típicamente un dímero muy asimétrico; esta asimetría parece ser mantenida también en la holoenzima (Zoller y Taylor, 1979). La estructura de dominios de la subunidad regulatoria incluye los dominios de dimerización, localización subcelular, inhibición de la subunidad catalítica y unión de cAMP (Fig.3).

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

Tanto la RI como la RII son fosforiladas por otras quinasas de proteínas; la RI es fosforilada por PKG, en una serina próxima al sitio de pseudosustrato (Hasimoto, *et al.*, 1981); la RII es fosforilada en la serina 95 por la misma PKA (Rangel-Aldao y Rosen, 1977), y además tiene otros cuatro sitios de fosforilación más que están entre los residuos 44 y 76, los cuales son fosforilados por la glucógeno sintetasa quinasa y la caseína quinasa II (Hemmings *et al.*, 1982).

La subunidad regulatoria es un dímero estable, que permanece intacto después de la liberación de las subunidades catalíticas.

Las únicas subunidades regulatorias que no forman dímeros son las de *Dictyostelium discoideum* (Mutzel *et al.*, 1987) y *Saccobolus platensis* (Silberstein *et al.*, 1990).

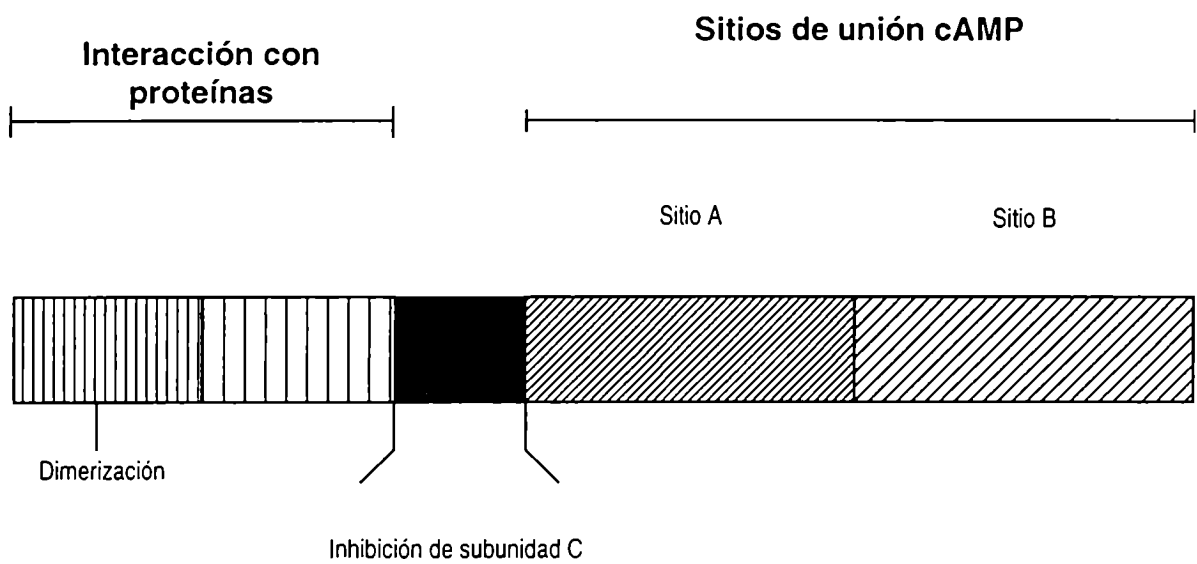


Figura 3- Subunidad reguladora de PKA. Estructura de dominios.

En RI, los monómeros están unidos covalentemente por uniones disulfuro formadas entre la Cis 16 y la Cis 37 (Zicks y Taylor, 1982). La dimerización de RII no involucra cisteínas, sino que es mantenida por interacciones entre los residuos de la terminación amino.

La localización subcelular de la PKA está dirigida por la subunidad R. La RI es principalmente citoplasmática y la RII es generalmente particulada y está asociada a la membrana citoplasmática, citoesqueleto, gránulos secretorios o membranas nucleares. La localización de la RII está dada por la asociación de esta subunidad con proteínas específicas denominadas "proteínas de anclaje" o "AKAPs" (A Kinase Anchoring Proteins) (Scott y Mc Cartney, 1994; Rubin *et al.*, 1979; Coghla, *et al.*, 1993; Bregman *et al.*, 1989; Carr *et al.*, 1991). No se ha demostrado la existencia de AKAPs para PKAI, pero recientemente se ha descrito la especificidad dual para una AKAP, designada D-AKAP1, tanto para RI_α como RII_α (Huang *et al.*, 1997); se ha encontrado a RI_α asociada a complejos durante la activación de células T (Skalhegg *et al.*, 1994) y unida a la proteína adaptadora Grb2 pudiendo interactuar con receptores de membrana en células MCF-10A (Tortora *et al.*, 1997).

También se ha encontrado que la AKAP79 una calcineurina, una fosfatasa del tipo 2B, y PKC además de PKAII (Klauck *et al.*, 1996) sugiriendo el entrecruzamiento de las vías de transducción de señales.

La región principal, pero no la única, que es esencial para la interacción con la subunidad catalítica, es la región conocida como "hinge" o "bisagra", ubicada entre los residuos 90 y 100 en la subunidad regulatoria. Esta zona es sensible al clivaje proteolítico, en particular a la tripsina y está protegida del ataque proteolítico cuando la R forma parte de la holoenzima.

RI posee en esta región una secuencia de pseudosustrato o pseudofosforilación, en la cual la Ser está reemplazada por Ala o Gly. En cambio las RII poseen una serina que cuando se autofosforila conduce a una reducción en la afinidad de la R por la C de casi 10 veces (Rangel-Aldao y Rosen, 1977).

Además de la subunidad regulatoria, la subunidad catalítica puede ser inhibida por la proteína inhibidora termoestable (PKI), la cual posee un sitio de pseudofosforilación como la RI, y es un inhibidor competitivo con respecto a los péptidos sustratos (Walsh *et al.*, 1971; Whitehouse y Walsh, 1982). Esta inhibición no puede ser revertida por cAMP.

Cada monómero de R posee dos sitios de unión de cAMP, los cuales están localizados después del sitio de dimerización y la región de pseudosustrato. Estos sitios son denominados sitio A y sitio B, y son el resultado de duplicación génica (Shabb y Corbin, 1992). Ambos sitios tienen diferentes velocidades de intercambio de cAMP y especificidades por los análogos de cAMP. El sitio A tiene preferencia por los análogos sustituidos en N-6 y C-6, mientras que el sitio B tiene preferencia por los sustituidos en C-8 (Shabb y Corbin, 1992). Estos sitios actúan de manera sinérgica durante la activación de PKA (Døskeland y Øgreid, 1984).

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

El cAMP disminuye la afinidad entre R y C por dos mecanismos. Por un lado se cree que se induce un cambio conformacional que afecta a la región "bisagra", la cual ya hemos dicho que es la principal región involucrada en la inhibición de C por R. Por otro lado se postula que se induciría un cambio conformacional de R que alteraría regiones de contacto entre R y C fuera de la región "bisagra". También se propone un modelo que sería la combinación de ambos efectos (Døskeland *et al.*, 1993).

Si bien el cAMP induce la disociación de la holoenzima, a concentraciones extremadamente bajas de enzima la PKA se disocia en ausencia de cAMP, tal como lo sugiere la K_{eq} de la reacción de disociación, por el contrario a concentraciones muy altas de enzima la holoenzima persiste aún a concentraciones saturantes de cAMP (Døskeland *et al.*, 1993).

ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO DE LA PKA

Cuando una enzima multisustrato como la PKA se activa, el evento fisiológico final surge como resultado de la regulación coordinada entre la secuencia de fosforilaciones y los cambios sufridos por los sustratos en sus actividades y/o propiedades.

La PKA fosforila muchas proteínas. Aunque los sustratos muestran poca similitud aparente, deben tener alguna estructura en común que es reconocida por el sitio activo de la PKA. Primero se propuso que el común denominador sería una adecuada estructura tridimensional del sustrato (Lanagan, 1973). Pero luego Kemp (Kemp *et al.*, 1975) estudiando variantes de la β -caseína, tuvo evidencias de la importancia de la

estructura primaria en la región de la serina fosforilable. Realizando estudios sobre la piruvato quinasa, sustrato de la PKA, fue posible sintetizar un heptapéptido, el cual resultó ser un excelente sustrato, *in vitro*, con valores de K_m del orden de la concentración de la piruvato quinasa *in vivo* (Kemp *et al.*, 1976); este sustrato se denominó Kemptido y ahora sirve como sustrato universal para la PKA. La secuencia de este heptapéptido es Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly.

Haciendo estudios de sustitución de aminoácidos en el Kemptido, se demostró la importancia de los residuos arginina ubicados hacia el lado amino de la serina fosforilable (Kemp *et al.*, 1977). Cambios en la posición de esas argininas, ya sea ubicándolas más próximas o más lejanas de la serina aceptora de fosfato, o la sustitución de estas argininas por lisina hacen que el péptido sea un pobre sustrato de la PKA. Por lo tanto de esto surge que las propiedades cinéticas de sustratos óptimos no soportan alteraciones estructurales.

Estudios de estructura cristalina de la subunidad C unida al PKI, apoyan la idea que sostiene que la unión a una secuencia específica de aminoácidos es necesaria para una interacción óptima de alta afinidad. Se demostró que la mayoría de los sitios de unión del PKI están ubicados en el lóbulo menor de la subunidad C. Existen residuos ácidos que son importantes para hacer contactos de tipo electrostáticos con los residuos arginina del PKI. También se identificaron interacciones no electrostáticas entre el PKI y la C; se determinó que residuos hidrofóbicos ubicados a ambos lados de la serina fosforilable (P+1 y P-11), se unirían a un bolsillo ubicado en el lóbulo menor. Por inferencia se postulan estos sitios de contacto para las proteínas sustrato (Knighton *et al.*, 1991).

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

Sustituciones en las argininas clave por lisinas o cambios en la ubicación de estos residuos con respecto a la serina fosforilable, dos situaciones que producen efectos drásticos en la capacidad de un péptido de ser sustrato de PKA *in vitro*, son

fenómenos comunes en los sustratos naturales. La sustitución de un residuo hidrofóbico ubicado inmediato a la serina fosforilable del lado carboxilo, es también pobremente tolerado en los péptidos ensayados *in vitro*; sin embargo es otra variación común encontrada en los sustratos naturales.

Esta flexibilidad en la secuencia de los sustratos sugiere que éstos presentan una amplia variedad de afinidades por la quinasa. Los sustratos de una enzima que tiene múltiples sustratos, como es el caso de la quinasa, compiten por la interacción con la enzima produciendo un orden temporal en la fosforilación. Por lo tanto la variación de secuencias de los sitios de fosforilación de los sustratos de PKA puede ser la base del orden en las fosforilaciones.

Los sustratos con diferentes secuencias que rodean el sitio de fosforilación no sólo tendrían afinidades diferentes por la quinasa sino también podrían influir en el proceso intrínseco de catálisis, ya que las diferencias en la unión de los sustratos podría reflejarse en diferencias en la unión de los productos fosforilados. Esto último es un paso limitante de la velocidad del proceso de catálisis (Adams y Taylor, 1993). Todo esto llevaría a diferentes velocidades de fosforilación, lo cual sería importante en la dinámica de la transducción de la señal, indicando el orden de los eventos de la fosforilación de las proteínas dentro de la célula.

Para considerar una proteína como sustrato de la PKA se debe cumplir que :

- su fosforilación *in vivo* debe surgir en respuesta a un incremento en el cAMP, inducido por un estímulo,
- el sitio donde se fosforila debe ser el mismo que se fosforila por PKA *in vitro*,
- las propiedades funcionales de la proteína deberán sufrir cambios que correlacionen con el grado de fosforilación
- el grado de fosforilación debe correlacionar con el grado de activación de la PKA.

Un importante indicio de que la fosforilación pudiera tener significación fisiológica sería que la reacción de fosforilación tuviera una K_m aparente del orden de su concentración *in vivo* (Krebs y Beavo, 1979).

En la Fig.4 están agrupados los sustratos encontrados para PKA. Se puede apreciar que no todos corresponden a la secuencia consenso Arg-Arg-X-Ser.

Se puede afirmar entonces que varios parámetros dentro de la célula pueden afectar la eficiencia con que las proteínas son utilizadas como sustratos por la PKA.

Glucógeno sintetasa de músculo(1 α)	RNIRAPQWPRRASCT
Fosforilasa quinasa 1a	KSEIKQVEFRRLSIS
Proteína fosfatasa 1	KPGFSPQPSRRGSES
Piruvato quinasa de hígado de cerdo	EGPAGYLRRASLA
CREB de cerebro de rata	SQKRREILSRRPSYR
Tirosina hidroxilasa de hígado	AVTSPRFIGRRQSLI
Subunidad RII de PKA	DVPIPGRFDRRV SVC
Fosfolamban	VQYLTRS AIRRASTI
Receptor de acetil colina γ	PDWQNDLKLRRSSSV
Pro-ANP	GPRSLRRSSCF
Inhibidor 1 de proteina fosfatasa	PEAAEQIRRRRTSPA
PFK\ fructosa bifosfatasa	SSSSSVLQRRRGSSI
Proteina ribosomal S6	KRQEQIAKRRRLSSL
Troponina de corazón de conejo	AGEAKPAPAVRRSDR
Lipasa hormona sensible	HGFWALTESMRRSVS
PFK	EHAHLEHISRKRSGE
Fenilalanina hidroxilasa	VVLGNGVLSRKL SDF
MLCK	TGHAVRAIGRLSSMA
Fructosa bifosfatasa	EIYNKDKAKSRPSLP
Fosforilasa quinasa β	VLERRARTKRSGSVY
Glucógeno sintetasa de músculo (1b)	CTSSSGGSKRSNSVD
Glucógeno sintetasa de Músculo (2)	PLSRTL SVS
Carboxilasa Acetil CoA	SALQDGLAFHMRSSM
ATP Citrato liasa	GSTSTPAPSRTASFS
Subunidad Catalítica de PKA (ser 338)	NFDDYEEEEIRVSIN

Figura 4- Sustratos de PKA que se encuentran en mayor concentración en las células.

Estos pueden ser categorizados en tres grupos:

- 1) la localización subcelular de la quinasa y el sustrato proteico,
- 2) las características inherentes a las estructuras de los sustratos,
- 3) las modificaciones en estas estructuras que son una consecuencia de interacciones alostéricas o modificaciones covalentes.

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

Recientemente se ha sugerido la idea del transporte de la PKA o de sus subunidades a sitios subcelulares específicos, al comprobarse que el PKI podría actuar secuestrando C. El PKI actuaría no sólo inhibiendo a la quinasa sino también intervendría en la localización subcelular de C en presencia de cAMP impidiendo su entrada al núcleo o favoreciendo su salida del mismo (Fantozzi *et al.*, 1994).

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

2) La secuencia de aminoácidos que rodea a la serina blanco de fosforilación afecta su posibilidad de ser fosforilada por la PKA. Esto está influido también por la estructura terciaria de la proteína. El orden en que son fosforilados los sustratos de una quinasa que posee múltiples sustratos depende en parte de la eficacia de esa proteína para ser sustrato.

3) Una proteína tiene un potencial de ser sustrato que está determinado por su estructura; modificaciones en la estructura pueden alterar ese potencial. Modificaciones covalentes como las fosforilaciones inducen cambios conformacionales en las proteínas, que regulan su habilidad para servir a su vez como sustrato de fosforilación. También pueden ocurrir cambios conformacionales en las proteínas por modificaciones no covalentes, como puede ser la interacción con moduladores alostéricos.

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

CONTROL DE LA SINTESIS Y DE LA DEGRADACION DE LAS SUBUNIDADES DE LA PKA

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

Primero se observó que PKA I y PKA II, estaban diferencialmente expresadas en los tejidos, sin encontrarse una correlación clara con la función del tejido (Corbin *et al.*, 1975). Luego se determinó que en tejidos de los órganos sexuales dependientes de esteroides, el incremento en la expresión de RI, correlacionaba positivamente con el crecimiento inducido por la hormona, lo cual llevó a la hipótesis que la PKAI era promotora de crecimiento (Russel, 1978). Una explicación podría ser que el gen de RI α responde generalmente más rápido que el gen de RI β a la demanda de un incremento en la síntesis de R, como cuando los tejidos crecen rápidamente en respuesta a hormonas, regeneración o realimentación (Russel, 1978; Ekanger *et al.*, 1990.).

El cAMP mismo, influye sobre la expresión de PKA. Se ha visto que el cAMP induce RI α y RI β en distintas líneas celulares (Gross y Rubin, 1990; Landmark *et al.*, 1991). En respuesta a altos niveles de cAMP puede ocurrir una regulación negativa de la actividad de PKA, como consecuencia de una disminución en los niveles de subunidad C, presumiblemente por la acción de una proteasa con eficiencia particular por la subunidad C libre (Alhanaty y Shaltiel, 1979). La regulación negativa de la PKA también se puede alcanzar por un aumento en los niveles de la subunidad R, relativos a C (Ekanger *et al.*, 1990, Houge *et al.*, 1990). Se encontró una secuencia consenso de respuesta a cAMP en el promotor de RI α , que podría explicar la transcripción estimulada por cAMP (Taskén *et al.*, 1991) de esta subunidad. Aunque se ha demostrado la estabilización de RI por cAMP (Jackiw y Hunzicker-Dunn, 1992) es más común que el cAMP promueva la degradación de R por proteólisis diferencial de la R libre después de su disociación de C (Steinberg y Agard, 1981). El cAMP puede aumentar los mRNA de RI β , por activación transcripcional y por estabilización del mRNA (Taskén *et al.*, 1991, Gross y Rubin, 1990).

QUINASA DE PROTEINAS DEPENDIENTE DE cAMP DE *MUCOR ROUXII*

En eucariontes inferiores se han descrito a nivel genético quinasas de proteínas dependientes de cAMP. Se describió un solo gen que codifica para la subunidad R en *S.cerevisiae* (Toda *et al.*, 1987), *D.discoideum* (Mutzel *et al.*, 1987), *Caenorhabditis.elegans* (Lu *et al.*, 1990), *Blastocladiella emersonii* (Marques, *et al.*, 1992), *Ustilago maydis* (Gold *et al.*, 1994) y *Neurospora crassa* (Bruno *et al.*, 1996). Para la subunidad C se describió un solo gen en *C.elegans* (Gross *et al.*, 1990), *N. crassa* (Yarden *et al.*, 1992) y *B.emersonii* (Oliveira *et al.*, 1994), dos genes para *U. maydis* (Durrenberger *et al.*, 1998) mientras que en *S.cerevisiae* se han aislado tres genes (Toda *et al.*, 1987).

Por ensayos bioquímicos se ha descrito además actividad quinasa dependiente de cAMP en *N.crassa* (Glikin *et al.*, 1982), *U. maydis* (Kerner y Passeron, 1984), *Trypanosoma cruzi* (Ulloa *et al.*, 1988), *Paramecium tetraurelia* (Hoechststrasser y Nelson, 1989), *Saccobolus platensis* (Silberstein *et al.*, 1990), y *Candida albicans* (Zelada *et al.*, 1998).

La quinasa de proteínas dependiente de cAMP del hongo *Mucor rouxii* es una enzima tetramérica, R_2C_2 , con un peso molecular de 240 kD, cada subunidad C tiene un peso molecular de 40kD y cada subunidad R tiene un peso molecular de 75 kD, siendo éste inusualmente grande entre las quinasas (Pastori *et al.*, 1985). Se determinó la existencia de dos sitios de unión de cAMP por monómero de subunidad regulatoria, como en la de los eucariotas superiores, existiendo cooperatividad positiva entre ellos. También como en la enzima de mamíferos hay sinergismo en la activación de la enzima por análogos específicos de uno y otro sitio (Paveto *et al.*, 1989).

Se ha observado que la subunidad R de la PKA sufre autofosforilación; esto produce una disminución en la interacción entre R y C, favoreciendo el proceso de activación y disociación por cAMP (Rossi *et al.*, 1992).

Se ha reportado que esta quinasa de proteínas presenta la propiedad inusual de no ser disociada por cAMP solo (Moreno y Passeron, 1990). Por incubación de la holoenzima con cAMP se forma un complejo ternario R_2C_2 -cAMP₂ (Pastori *et al.*, 1981), en el cual el cAMP se une sólo al sitio 1 (Paveto *et al.*, 1989). La disociación de la

enzima se logra cuando se agrega NaCl, histona o protamina junto con el cAMP (Moreno y Passeron, 1980; Pastori *et al.*, 1981); es bajo esas condiciones que los cuatro sitios de unión a cAMP se encuentran ocupados (Paveto *et al.*, 1989).

Se estudió también la influencia del sustrato proteico en la disociación de la PKA por cAMP y se observó que la activación de la enzima al usar sustratos básicos como protamina e histona era mayor que por el heptapéptido sintético kemptido. Se encontró además que los policationes: polilisinas, histonas y poliaminas, producen estimulación en la activación de esta enzima por cAMP cuando se usa kemptido como sustrato. Se postuló, a partir de estos resultados, que la presencia de dominios básicos en el sustrato proteico o la presencia de poliaminas tiene gran importancia en la activación de la quinasa de proteínas de *M.rouxii* por cAMP (Guthman *et al.*, 1990).

Se caracterizaron los parámetros cinéticos de 17 péptidos frente a la subunidad catalítica aislada de la PKA, se seleccionaron tres de ellos y se estudió el comportamiento de la holoenzima frente a cAMP determinándose que la $A_{0.5}$ para la activación por cAMP depende de la cantidad de enzima utilizada en el ensayo; que la $A_{0.5}$ usando la misma cantidad de enzima, es diferente según el péptido usado como sustrato; el péptido inhibidor de la quinasa (PKI) inhibe a la PKA a concentraciones mayores que las necesarias para inhibir la subunidad catalítica libre y que la actividad enzimática relativa con cinco sustratos peptídicos referida a protamina no es una constante, varía con la concentración de enzima y de cAMP y es diferente a la actividad enzimática relativa de la subunidad C libre. Estas evidencias más las aportadas por Guthman sugieren que la activación a altas concentraciones de holoenzima, como ocurre en el interior de la célula, es altamente dependiente de otros factores, además de cAMP y que sería posible que la holoenzima fuera activa sin necesidad de disociación (Zarembeg, *et al.*, manuscrito en preparación).

Se demostró también la existencia de una forma de holoenzima dimérica, que se denominó R'C cuyo peso molecular oscila entre 80 y 90 kD . Se encontró en cultivos de fase estacionaria, y se la pudo obtener también por proteólisis limitada de la holoenzima nativa. Se determinó que el peso molecular de R' es de 38 kD (Paveto *et al.*, 1989; Paveto, 1987).

Se ha clonado la región de la subunidad R que contiene los dominios de unión a cAMP, encontrándose aproximadamente 45% de identidad y 60% de similitud entre las

secuencias de las todas las R clonadas hasta el momento y la de *M. rouxii*, excepto con la R de *B. emersoni*, con la cual tiene una correlación mucho mayor : 61% de identidad y 75% de similitud (Rossi *et al.*, manuscrito en preparación).

EFECTOS DEL cAMP MEDIADOS POR LA PKA

Un gran número de hormonas, neurotransmisores y otras sustancias de señalización que se unen a receptores acoplados a proteínas G, convergen sus señales hacia un único segundo mensajero, el cAMP. Numerosos grupos de investigación están dedicados a dilucidar cómo se puede mantener la especificidad en un sistema de transducción de señales donde múltiples estímulos extracelulares conducen a un vasto espectro de respuestas intracelulares, todas mediadas por el mismo segundo mensajero.

La respuesta podría estar en el amplio número de isoenzimas de PKA, formadas por homo y hétérodímeros de R (RI_α, RI_β, RII_α, RII_β), asociadas a diferentes subunidades catalíticas (C_α, C_β, C_γ). Estas isoenzimas poseen diferentes propiedades bioquímicas, se expresan en diferentes tejidos y son reguladas diferencialmente a nivel de transcripción génica, estabilidad de mensajeros y estabilidad de proteínas (Skalhegg y Taskén, 1997).

Además existen las AKAPs que permiten una localización subcelular específica para PKAII, sugiriendo funciones diferentes para las isoenzimas.

Los receptores que activan PKA a través de la generación de cAMP, regulan un gran número de procesos celulares tales como metabolismo (Krebs y Beavo, 1979), regulación génica (Roesler *et al.*, 1988), crecimiento y división celular (Boynton y Whitfield, 1983), motilidad espermática (Tash *et al.*, 1984), conductividad de canales iónicos (Li *et al.*, 1993) y diferenciación celular (Liu, 1982; Schwartz y Rubin, 1983).

Sumados a estos procesos intracelulares se ha postulado un rol extracelular para la PKA en sangre. Cuando se estimula fisiológicamente a las plaquetas se produce la liberación de PKA junto con ATP y Mg⁺⁺ al torrente sanguíneo y se observa la fosforilación de vitronectina, una proteína multifuncional asociada a procesos de activación plaquetaria (Shaltiel *et al.*, 1993).

DIFERENCIACION MEDIADA POR PKA EN EUKARIONTES SUPERIORES

Pall (1981) propuso seis criterios a tener en cuenta para considerar que una función específica es controlada por cAMP

- 1) correlación entre los niveles endógenos de cAMP y la función propuesta.
- 2) correlación de la activación de la PKA con la función propuesta
- 3) influencia sobre esa función del cAMP o sus análogos
- 4) influencia sobre esa función de drogas que afecten la adenilato ciclasa y la fosfodiesterasa de cAMP
- 5) cambios en esa función en mutantes con niveles aumentados o disminuidos de cAMP
- 6) control por cAMP de dicha función en un sistema libre de células.

Para sugerir un rol para el cAMP en diferenciación deberían cumplirse cuatro o más de esos criterios.

Las primeras observaciones que relacionaron PKA y diferenciación en fibroblastos fueron correlaciones entre los niveles de cAMP y la inhibición por contacto del crecimiento en células en cultivo. Líneas celulares transformadas que no exhibían inhibición por contacto tenían niveles de cAMP muy inferiores a sus controles no transformados y desarrollaban morfologías aberrantes; el tratamiento con cAMP, dbcAMP o teofilina, un inhibidor de la PDE, restauraban la inhibición del crecimiento y modificaban su morfología (Burk, 1968; Heidrick y Ryan, 1970; Sheppard, 1971) Posteriormente se observó que los niveles de cAMP se incrementaban con la densidad celular (Otten *et al.*, 1971).

En varias líneas celulares derivadas del mesénquima tales como adipocitos, condriocitos, osteoblastos y células sinoviales la forma es importante para el mantenimiento de su función. La forma de las células mesenquimales en monocapa depende de la densidad celular; a baja densidad son elongadas y a alta densidad son redondeadas (Otten *et al.*, 1972). Los mecanismos por los cuales se relaciona la forma adoptada por la célula con la densidad celular no se conocen totalmente, pero se reportó que en varias de estas líneas celulares la polimerización de microfilamentos disminuía con el aumento de la densidad celular (Heacock *et al.*, 1984; Unemori y Werb, 1986).

En la superficie de los huesos en crecimiento se encuentran los osteoblastos; los cuales durante la diferenciación forman una capa contigua de células cúbicas

polarizadas hacia la capa inferior de hueso hacia donde secretan numerosas proteínas de matriz.

En estas células la hormona paratiroidea estimula la acumulación de cAMP y produce cambios morfológicos similares a los que se observan a alta densidad celular, así como reducción del citoesqueleto de actina y de la miosina asociada a citoesqueleto. En cultivos primarios de osteoblastos se reportó que los niveles de cAMP se elevaban por encima de cierta densidad celular y esto correlacionaba con la despolimerización de actina, la disminución en la miosina asociada a microfilamentos y la diferenciación morfológica. Agentes que elevaban los niveles de nucleótido cíclico tales como forskolina, un activador de la AC e inhibidores de la PDE producían cambios similares en la morfología y el citoesqueleto (Egan *et al.*, 1991)

Se postuló que la despolimerización del citoesqueleto podría deberse a la inactivación de la quinasa de la cadena liviana de miosina (MLCK) por fosforilación dependiente de cAMP, como se propuso en músculo esquelético (Adelstein *et al.*, 1978) o por la activación de la fosfatasa de MLC, lo cual conduciría a una disminución en la fosforilación de miosina con la consecuente pérdida de interacción con el citoesqueleto (Egan *et al.*, 1991).

Al igual que en células de origen mesenquimático, la elevación del cAMP en células mesangiales en cultivo causa redondeo de las células, pérdida de adhesividad, fragmentación del citoesqueleto y desfosforilación de la cadena liviana de la miosina (Glass y Kreisberg, 1993). Los mismos cambios morfológicos en respuesta a los niveles elevados de cAMP fueron reportados en células CHO (Hsie y Puck, 1971), células epiteliales del iris (Ortiz *et al.*, 1973), células gliales (Steinbach y Schubert, 1975), células óseas (Miller *et al.*, 1976) y células de Sertoli (Spruill *et al.*, 1981). La diversidad de tipos celulares que exhiben cambios similares sugieren mecanismos comunes por medio de los cuales las células regulan el citoesqueleto y con ello su morfología y adhesividad.

DIFERENCIACION MEDIADA POR PKA EN HONGOS

En hongos existen fuertes evidencias que vinculan la transducción de señales por cAMP con los procesos de diferenciación.

Varios procesos de diferenciación tales como la formación de apresorios en *Uromyces phaseoli* (Hoch y Staples, 1984), la formación de esclerotios en *Rhizoctonia solani* (Hashiba, 1982) y la conidiación en *Trichoderma viride* (Farkas *et al.*, 1985) pueden ser desencadenados por el agregado de cAMP exógeno, inhibidores de la PDE o activadores de la adenilato ciclasa.

La cascada del cAMP está involucrada también en la esporulación en *S. cerevisiae* (Ishikawa, 1989), en el inicio de la meiosis se necesita un nivel bajo de cAMP o la ausencia de actividad de PKA, mientras que altos niveles de cAMP son necesarios para la esporulación normal de levaduras (Matsumoto *et al.*, 1983).

En los últimos años y simultáneamente con el desarrollo de esta tesis abordajes de ingeniería genética y biología molecular condujeron a las siguientes observaciones :

En *N. crassa* un mutante de la subunidad regulatoria de la PKA no puede emitir tubo germinativo cuando crece a una temperatura restrictiva, la pared de estas células está engrosada y es muy frágil, las células se lisan con facilidad. Esta fragilidad no puede ser compensada agregando estabilizantes osmóticos al medio de cultivo. Otros procesos de diferenciación como la septación no se ven impedidos pero la localización del septo está alterada (Bruno *et al.*, 1996).

En *Aspergillus niger* la sobreexpresión de la subunidad catalítica de PKA produce alteraciones morfológicas, las colonias son más compactas La esporulación se ve afectada, disminuyendo en algunas transformantes y desapareciendo completamente en otras (Bencina *et al.*, 1997).

En *U. maydis* se han caracterizado una subunidad R del tipo RII y dos subunidades C de PKA, producto de genes diferentes. Este hongo es dimórfico, creciendo saprofiticamente como levadura y variando a crecimiento filamentoso cuando infecta maíz. La interrupción del gen *ubc1*, que codifica para R o la interrupción del gen *adr1*, que codifica para la subunidad C que se expresa mayoritariamente, produce crecimiento filamentoso en condiciones en las cuales el organismo crece como levadura; este crecimiento polarizado no es invasivo, ya que la polarización se da sin que se forme el heterodicarion, que es esencial para conferirle carácter invasivo. La interrupción del gen *uka1*, que codifica para la otra subunidad C no produce alteraciones apreciables en la morfología, la formación del heterodicarion o en su capacidad de infectar maíz (Gold *et al.*, 1997; Durrenberger *et al.*, 1998).

MORFOGENESIS EN *MUCOR ROUXII*

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

Los zigomicetes comparten, como propiedad que los caracteriza, la posibilidad de producir esporas de pared gruesa, llamadas zigoesporas, como resultado de la reproducción sexual. Todas las especies de *Mucor* son capaces de formar zigoesporas pero algunas de ellas son homotálicas y otras heterotálicas. Las zigoesporas se desarrollan en los gametangios, que se forman en respuesta a la presencia de ácido trispórico secretado como prohormona por los tipos de apareamiento opuestos. La cariogamia y la meiosis ocurren en la zigospora en desarrollo (Gooday, 1974).

Estos organismos pueden producir además otros dos tipos de esporas: las artrosporas y las esporangiosporas. Las artrosporas surgen como respuesta adaptativa, luego de cesar el crecimiento logarítmico o en respuesta a condiciones nutricionales o ambientales desfavorables. Se forman por la septación, engrosamiento y posterior liberación de los extremos de las hifas, en cultivos líquidos. Las condiciones de máxima esporulación en *Mucor rouxii* suceden en un medio rico con peptona y extracto de levadura, en ausencia de una fuente de carbono fermentable, suplementado con acetato de potasio (Barrera, 1983).

Las esporangiosporas surgen de estructuras denominadas esporangióforos, que se forman en los extremos de las hifas cuando el microorganismo crece sobre medio sólido y bajo condiciones aeróbicas.

Si bien muchas especies de *Mucor* comparten características comunes sobre la formación de esporas existe una cualidad que distingue a algunas de ellas el dimorfismo, esto es la capacidad que tienen algunos hongos de crecer como micelio o levadura. El equilibrio entre las dos morfologías está gobernado por factores ambientales y/o nutricionales.

Los hongos dimórficos no se agrupan según un grupo taxonómico particular e incluyen a algunos Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes y Zygomycetes, algunos de los cuales son importantes patógenos de humanos y plantas; otros son saprófitos.

M. rouxii es un hongo saprófito, homotálico y dimórfico cuyas esporas pueden desarrollarse como micelio cenocítico o como levadura, según las condiciones ambientales y nutricionales.

Las esporangiosporas de *M. rouxii* son elipsoidales, uninucleadas, con una pared celular muy diferente que la de la célula vegetativa, tanto química como morfológicamente. Está relativamente enriquecida en proteínas y lípidos, contiene glucanos y melanina, los cuales están ausentes en las paredes de las formas vegetativas. Por otra parte los niveles de quitina, quitosano, ácido glucurónico y fosfato son menores en las esporas.

Las esporas pueden desarrollarse como un micelio cenocítico filamentososo o bien como células levaduriformes, pero independientemente de como sea la morfología final adoptada por el microorganismo comparten los mismos estadios iniciales. La espora adquiere una morfología esférica sin aumentar su eje mayor, luego crece isodiamétricamente. Aumenta aproximadamente 20 veces su volumen durante el período de crecimiento isodiamétrico, produciéndose además de la rehidratación síntesis activa de RNA, proteínas, formación de organelas y desarrollo de una nueva pared celular (Bartnicki-García, 1963; Bartnicki-García *et al.*, 1968). El tipo y cantidad de macromoléculas sintetizadas parece ser crítico ya que podrían determinar o dirigir el tipo de morfología.

Si las condiciones ambientales son aeróbicas la célula adquiere un volumen de aproximadamente $650 \mu\text{m}^3$ y comienza a emitir cortas proyecciones llamadas tubos germinativos; a partir de éstos y por crecimiento apical, se desarrolla una estructura multinucleada no septada tubular conocida como hifa cenocítica; la célula esférica no aumenta de volumen luego de comenzar la emisión de tubos germinativos. Las hifas sufren ramificaciones ocasionales, el crecimiento sucede únicamente por las puntas, es allí donde se sintetiza la nueva pared celular, la pared de la espora se fragmenta y queda adherida por encima de la pared vegetativa. A medida que el crecimiento de la hifa avanza el protoplasma se moviliza hacia la parte más joven del micelio, vaciando las partes más viejas que se septan y son abandonadas; este mecanismo le permite al hongo eliminar las hifas dañadas y utilizar todo el contenido celular en las hifas en crecimiento.

Puede obtenerse crecimiento filamentosos a partir de zigoesporas, artrosporas, esporangiosporas y levaduras.

Si la célula crece anaeróbicamente y con una fuente de carbono fermentable adquiere un volumen de aproximadamente $200 \mu\text{m}^3$ y comienza a emitir gemas, la célula madre sigue creciendo durante el proceso de gemación. Estas gemas aparecen al azar en el cuerpo de la madre y se desprenden luego de la septación con volúmenes muy variables; suelen producirse doce o más gemas por célula madre. Las levaduras son multinucleadas, esféricas y pueden llegar a medir $20 \mu\text{m}$ de diámetro, la pared celular se deposita uniformemente en toda la extensión celular. La morfología levaduriforme puede obtenerse a partir de artrosporas, esporangiosporas e hifas; no se ha reportado a partir de zigoesporas.

COMPOSICION Y CONSTRUCCION DE LA PARED CELULAR

El proceso morfológico es un ejemplo de diferenciación espacial en la biosíntesis de la pared, ya que es la pared celular la que determina la forma del hongo (Bartnicki-García, 1968).

Los principales componentes estructurales tanto en levaduras como en hifas son las fibras de quitina y quitosano embebidas en una matriz de poliuronidos, ácido mucónico, glicoproteínas y glicopéptidos (Bartnicki-García y Nickerson, 1962; Bartnicki-García y Reyes, 1968; Dow *et al.*, 1981; Dow y Rubery, 1977). La contribución de los componentes fibrilares a la masa total de pared celular no difiere mucho entre hifas y levaduras. La diferencia reside principalmente en la proporción de manosa y proteínas que es mucho menor en hifas que en levaduras, mientras que fucosa y galactosa es menor en levaduras que en hifas. No se conoce cómo esas diferencias cuantitativas pueden afectar la forma final adoptada por el hongo, pero puede ser que la composición química no tenga que ver con las estructuras asumidas y que el tipo o dirección de la polimerización sean las responsables de la arquitectura final.

La observación por microscopía electrónica de células de *Mucor* revela que la pared de las esporas está compuesta por una capa exterior fina y densa y una capa interior más extensa y transparente, siendo el espesor total de $0,10$ a $0,16 \mu\text{m}$ (Fig. 5A). La pared de la spora germinada aeróbicamente, tiene un espesor de $0,04$ a $0,06 \mu\text{m}$, es densa, no fibrosa e indiferenciada, presentando la misma estructura y espesor tanto en el tubo germinativo como en la hifa madura (Fig. 5B).

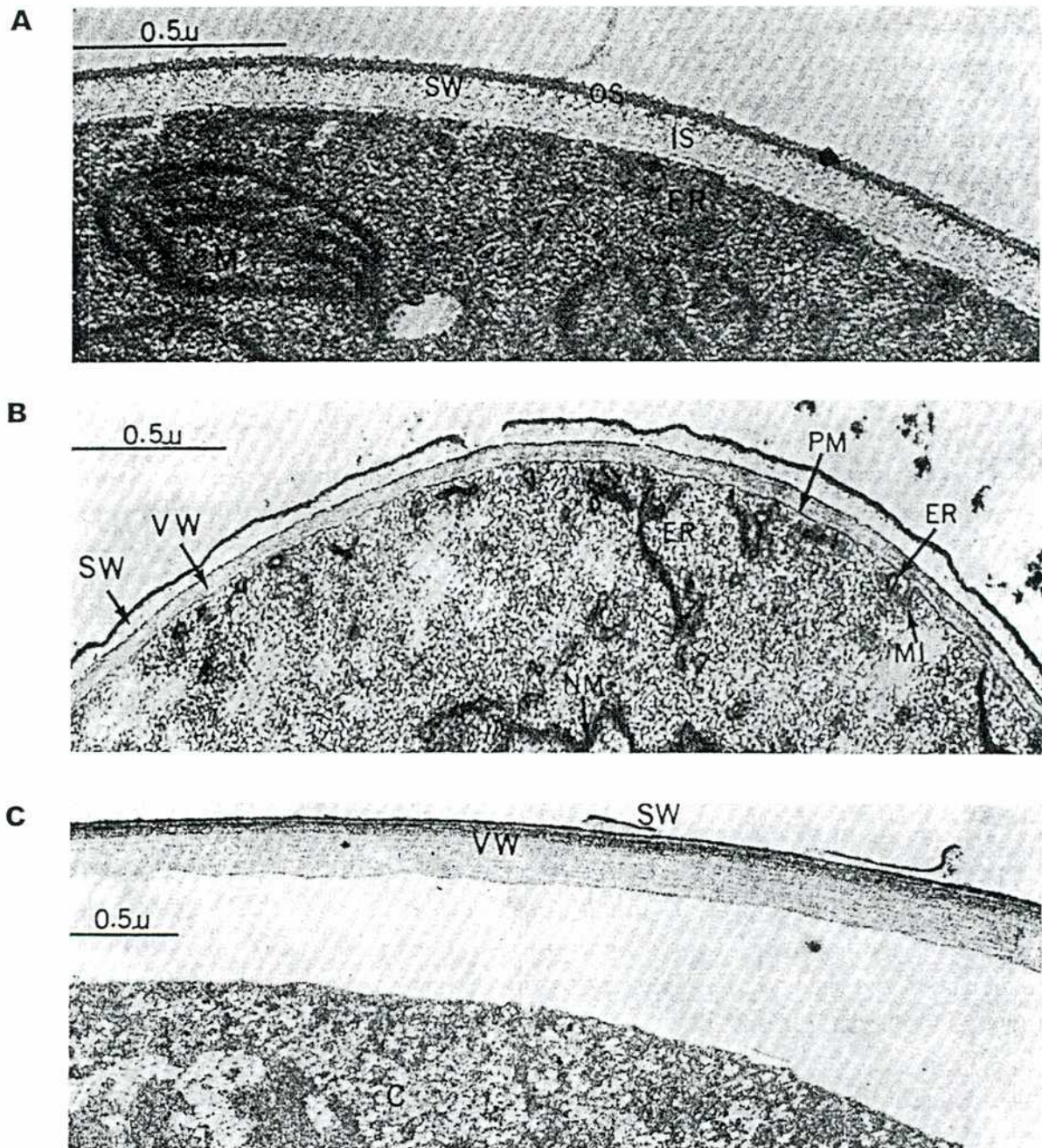


Figura 5- Ultraestructura de pared de *Mucor rouxii*. **A-** Esporangioesporas. **B-** Esporas cultivadas aeróbicamente. **C-** Esporas cultivadas anaeróbicamente bajo CO₂.
 C: citoplasma, OS: cubierta externa, PM: membrana plasmática, ER: Reticulo endoplasmático, M: mitocondria, NM: membrana nuclear, SW: pared de la spora, VW: pared vegetativa, IS: estrato interno.

Las paredes de las levaduras son gruesas, su espesor puede superar los 25 μm , las microfibrillas están más empaquetadas hacia el exterior celular, lo que aumenta la densidad y produce el efecto de una doble capa (Fig. 5C). La formación de la pared con precursores marcados revela que, en las levaduras, la deposición sucede por intercalación difusa, mientras que en la hifa es por extensión apical estricta. Se han encontrado estructuras apicales similares al "Spitzenkorper" descrito para ascomycetes y basidiomycetes en hifas de *Mucor* y se ha postulado que juegan un rol importante en la deposición de la nueva pared. No se han encontrado estructuras similares en levaduras. (Bartnicki-García *et al.*, 1968a; Bartnicki-García *et al.*, 1968b)

El crecimiento de las hifas ha sido caracterizado como un balance dinámico entre la síntesis y la degradación. La punta de la hifa en crecimiento es muy sensible a la ruptura con una variedad de agentes físicos y químicos, mientras que el resto de la pared celular es completamente resistente (Bartnicki-García *et al.*, 1972). La pared de la levadura por el contrario no se ve afectada por ningún tipo de agente.

El estudio de las diferencias en la pared celular se ha dirigido a diferentes aspectos estructurales; por un lado se ha estudiado la síntesis y deposición de la fracción quitina-quitosano, la que formaría el esqueleto de la pared celular; por otro lado se han caracterizado los quitosomas, organelas especializadas, las cuales sirven como sitio de síntesis de quitina y como vehículos para la deposición de quitina y quitosano (Bartnicki-García, 1981; Bartnicki-García y Bracker, 1984).

Otro enfoque ha sido el estudio de los poliurónidos en los que está embebido el esqueleto fibrilar. Se han caracterizado las enzimas responsables de la síntesis de ácido UDP-glucurónico en ambas morfologías, así como la incorporación de precursores y glicoproteínas marcados (Dow *et al.*, 1981; Dow y Villa, 1980).

Queda por estudiar en *M. rouxii* el rol de las glicoproteínas en la formación y mantenimiento de la arquitectura celular. Las glicoproteínas de hongos son principalmente manoproteínas que pueden dividirse en dos grupos según su acción presuntiva y su interacción con los componentes estructurales de pared. En el primer grupo están incluidas aquellas proteínas que están unidas débilmente a la pared y pueden extraerse con detergentes iónicos o agentes caotrópicos. En el segundo grupo se encuentran las glicoproteínas unidas covalentemente al esqueleto de la pared y que son liberadas sólo después de la degradación enzimática de la quitina y el quitosano; éstas son las que juegan un rol estructural.

En *C. albicans* se han encontrado diferentes proteínas específicas liberadas por degradación enzimática cuando se realizan los tratamientos sobre micelio o levadura, mientras que no se encontraron diferencias cualitativas entre ambas morfologías en las proteínas liberadas por detergentes (Sentandreu *et al.*, 1994).

La manera en que se sintetiza la pared se relaciona con el citoesqueleto el cual conduce y dirige las vesículas que contienen los precursores y las enzimas de síntesis. En general la transición de levadura a hifa representa un incremento en la polarización del crecimiento celular, siendo las pseudohifas estadios de polarización intermedia.

EL CITOESQUELETO Y SU ROL EN LA MORFOGENESIS

En hongos, el citoesqueleto cubre dos funciones : esqueléticas y musculares; es una trama que atraviesa todo el citoplasma y que contiene fibras de sostén que no son rígidas, las cuales pueden ordenar y conducir los elementos celulares y contra las cuales se pueden aplicar fuerzas. A diferencia del esqueleto de los animales, el de los hongos es altamente dinámico y puede armarse y desarmarse según las necesidades celulares. Los hongos poseen además un exoesqueleto, la pared celular, la cual probablemente interactúa directamente con el citoesqueleto. Las funciones musculares derivan de las diversas moléculas que interactúan con las partes estructurales del sistema generando fuerza y movimiento (Heath, 1994).

El citoesqueleto de hongos está compuesto por dos sistemas bien conocidos : los microtúbulos y los microfilamentos así como por sus proteínas de unión. Existen otros elementos menos caracterizados como los filamentos intermedios de los cuales existen evidencias en *Neurospora* y en *Saccharomyces* (Rosa *et al.*, 1990; McConnell y Yaffe, 1993).

Los microtúbulos están compuestos por 13 protofilamentos formando un haz cilíndrico, cada protofilamento es un heteropolímero de alfa y beta tubulina, también se ha descrito gamma tubulina, la cual no interactúa con las anteriores, sino que se asocia a los extremos de los filamentos y a los centros de organización. Se distribuyen solos o en haces de manera paralela al eje de la hifa o de la gema, siendo su longitud muy variable desde 0,1 μ m en el citoplasma hasta 10-20 μ m en los flagelos de zoosporas. Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) cumplen funciones de centros organizadores y de traslocadores. Se ha demostrado el rol de los microtúbulos en mitosis, meiosis y motilidad de organelas (Heath, 1994).

Los microfilamentos son homopolímeros de actina formados por dos cadenas lineales entrelazadas helicoidalmente formando filamentos de 7 nm de diámetro (F-actina); estos filamentos están polarizados, presentando un extremo de crecimiento rápido y otro de crecimiento lento, a los cuales se asocian diferentes proteínas de unión a actina (ABPs).

Los filamentos de actina son altamente lábiles a los procedimientos de fijación utilizados en microscopía electrónica y no son fácilmente detectables por métodos de citohistoquímica, probablemente porque la concentración de actina es baja; todo esto hace que no pueda conocerse en detalle su localización en muchos hongos. En cambio cuando los filamentos se unen en gruesos cables por acción de las ABPs, son de gran rigidez y visualizables por citohistoquímica. La actina se ha visto como placas asociadas al plasmalema, especialmente en las puntas de las hifas en crecimiento; en el citoplasma se ven cables de diámetro variable, predominantemente alineados en paralelo al eje mayor de crecimiento, el citoplasma también está atravesado por una trama difusa de F-actina (Heath, 1994).

La visualización de los microfilamentos se logra mediante la estabilización de los mismos con faloidina, la que a su vez se encuentra unida a colorantes fluorescentes como rodamina o fluoresceína. La faloidina es el miembro más importante de la familia de las falotoxinas, un grupo de heptapéptidos bicíclicos producidos por hongos (Cooper, 1987). También se pueden visualizar los microfilamentos con anticuerpos específicos unidos a colorantes fluorescentes.

Los microfilamentos se han asociado principalmente con morfogénesis y crecimiento apical (Heath, 1990), así como en citoquinesis (Watts *et al.*, 1985, 1987), septación (Marks y Hyams, 1985; Kanbe *et al.*, 1989), motilidad de organelas y motilidad citoplasmática (McKerracher y Heath, 1987).

En *M. rouxii* la actina fue identificada bioquímicamente por Sabanero y Zazueta en 1989 como una proteína de 43 kD, a la cual localizaron por citohistoquímica en las hifas en crecimiento. Hasek y Bartnicki-García en 1994 mostraron la distribución de microfilamentos y microtúbulos durante la germinación aeróbica.

Las citocalasinas son un grupo de metabolitos de origen fúngico capaces de unirse a los extremos terminales de los microfilamentos impidiendo su polimerización y despolimerización. Existe toda una familia de citocalasinas que actúan con diferente afinidad sobre microfilamentos de diferentes organismos; la más efectiva en hongos es

la citocalasina A la cual también afecta el transporte de monosacáridos a través de la membrana plasmática (Cooper,1987). Cuando se agrega citocalasina a una hifa en crecimiento cesa el crecimiento polarizado y la punta de la hifa comienza a redondearse e hincharse.

En *Mucor mucedo* la adición de citocalasina A a hifas en crecimiento fue analizada por microscopía electrónica observándose severas alteraciones morfológicas en la pared celular y la aparición de vesículas densas, que no se observan en condiciones fisiológicas (El Moughith *et al.*, 1984). Cuando el inhibidor de la filamentación se agrega a esporangiosporas en germinación se impide el crecimiento polarizado, la célula crece isodiamétricamente produciendo esferas gigantes y mostrando alteraciones en el patrón de deposición de quitina (El Moughith *et al.*,1988).

Estos procesos son reversibles, eliminando la citocalasina del medio de incubación, los organismos reanudan el crecimiento polarizado.

Existen inhibidores naturales de la polimerización de microtúbulos tales como la vinblastina, colchicina y vincristina y sintéticos como el nocodazol, no se han observado alteraciones en el crecimiento polarizado por el agregado de estos compuestos en hongos (Heath,1994).

La concentración de actina en las puntas de las hifas en crecimiento, especialmente en la forma de trama periférica apical (Heath, 1987, 1990), las alteraciones producidas por inhibidores de la filamentación (Allen *et al.*, 1980; Grove y Sweigard, 1980; Jackson y Heath, 1990) y las anomalías observadas en mutantes con defectos en las ABPs (Haarer *et al.*, 1990, Liu y Bretscher, 1992, Adams *et al.*, 1991) han contribuido a sugerir fuertemente que la actina cumple un rol muy importante en la morfogénesis.

En contraste no hay evidencias que relacionen a los microtúbulos con la emisión del tubo germinativo, ni con la morfología adoptada por las células, ya que cualquier perturbación producida en ellos no produjo alteraciones morfológicas.

MODELOS DE MORFOGENESIS EN HIFAS

Se han propuesto tres modelos para explicar cómo se genera el tubo de la hifa. Cada uno apela a diferentes criterios morfogenéticos.

-1) Cambios en las propiedades físicas de la pared: El crecimiento de la hifa sucede por un proceso que transforma los nuevos elementos de la pared, depositados en el ápice de la hifa; la pared naciente es plástica debido a la presencia de cadenas individuales de polímeros; a medida que las cadenas se entrecruzan adquiere rigidez y resistencia a la presión de turgencia presente en las hifas (Sietsma y Wessels, 1994).

-2) La expansión del citoplasma moldea la forma de la hifa: En este modelo el hongo es visto como un protozoo que vive dentro de un tubo rígido, la fuerza para el modelado de la hifa surge de un esqueleto subcortical de actina. (Heath, 1994; Money, 1994).

-3) Migración y deposición de vesículas. el centro distribuidor de vesículas: El modelo asume que la extensión de la hifa puede ocurrir en cualquier lugar sobre la superficie de la pared como resultado de la descarga de vesículas y propone que la expansión localizada de la pared es el resultado de tres efectos concomitantes: la deposición de polímeros de pared, la plasticidad de la pared obtenida por acción de enzimas líticas y la turgencia que expande la pared. El agente generador de la morfología reside en el mecanismo responsable de la distribución polarizada de las vesículas (Bartnicki-García *et al.*, 1990).

El modelo está avalado por la descripción de un gradiente de síntesis de pared en la punta de la hifa tanto en *M. rouxii* (Bartnicki-García y Lippman, 1977) como en otros hongos (Bartnicki-García, 1996). Pero no se ha demostrado el gradiente de plastización de la pared.

Basado en este modelo se desarrolló una simulación computarizada del crecimiento del micelio. La morfogénesis en este modelo está regulada por el movimiento del VSC (centro distribuidor de vesículas), el cual puede estar representado *in vivo* por el "Spitzenkorper". En teoría, un solo centro generador de vesículas que avanzara en línea recta podría explicar el crecimiento de la hifa, por ejemplo un aparato de Golgi ; pero en la práctica un solo Golgi no podría proveer la cantidad de vesículas necesaria para desarrollar las altas velocidades de crecimiento que se observan en muchos hongos, por eso un centro concentrador y distribuidor que recolectara las vesículas producidas en todo el citoplasma y con capacidad de migrar en diferentes direcciones podría cumplir esa función. El movimiento de las vesículas hacia la

membrana plasmática no es al azar como un movimiento browniano, sino que está facilitado por la interacción de ellas con el citoesqueleto. Dado que la actina se halla en grandes cantidades en las zonas de formación de pared y crecimiento apical se ha propuesto a los microfilamentos, a través de sus ABPs, como los transportadores.

La ecuación de la hifa es

$$y = x \cot(x V/N)$$

donde N es la cantidad de vesículas liberadas por el VSC en la unidad de tiempo y V es la velocidad del desplazamiento lineal del VSC.

Variando ambos parámetros es posible obtener todo un espectro de morfologías, incluyendo la ramificación del micelio y el dimorfismo.

La aplicación de este modelo se ve limitado por el hecho de que no se han reportado estructuras similares al "Spitzenkorper" en muchos hongos.

FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA MORFOGENESIS

A pesar de que no todas las especies del género *Mucor* responden morfológicamente igual al ambiente, hay dos generalidades que se pueden aplicar:

1) Siempre se requiere una hexosa fermentable para el crecimiento en forma de levadura.

2) La anaerobiosis generalmente acompaña (pero no determina) al crecimiento levaduriforme, mientras que una atmósfera aeróbica usualmente induce un crecimiento en forma de micelio (Orlowski, 1991).

M. rouxii no puede crecer como levadura en anaerobiosis sin una hexosa fermentable, y esta morfología parece desarrollarse a partir de un complejo balance entre la concentración de hexosa y la presión parcial de CO₂ (pCO₂) presentes en el medio de cultivo. A una baja concentración de hexosa (0,1% de glucosa) y en una atmósfera de nitrógeno, se necesita una alta pCO₂ (>0,3 atm) para inducir el crecimiento levaduriforme, mientras que con una concentración alta de hexosa (8% glucosa) este tipo de crecimiento puede ocurrir aún bajo una atmósfera 100% de nitrógeno (Bartnicki-García y Nickerson, 1962 a y b).

Se han estudiado un gran número de parámetros, intentando establecer una correlación entre éstos y la morfología. Dentro de los parámetros analizados se encuentran los niveles de moléculas endógenas como ser cAMP, calcio, poliaminas, metabolismo del carbono y del nitrógeno, factores relacionados con la síntesis de pared y macromoléculas (Orlowski, 1991).

El análisis de los niveles de cAMP reveló que las levaduras poseen niveles cuatro veces más altos de cAMP que el micelio en *M. rouxii*, y que la concentración del nucleótido cae durante la transición levadura-micelio (Cantore *et al.*, 1983).

Para analizar el efecto del cAMP sobre la morfogénesis en *Mucor* se han utilizado dos modelos experimentales :

En el primer modelo se analizó el efecto del agregado de dbutcAMP durante la transición levadura-micelio, provocada por el cambio de una atmósfera de CO₂ a una aeróbica. En estas condiciones las células permanecieron esféricas, no emitiendo tubo germinativo (Larsen y Sypherd, 1974; Paveto *et al.*, 1975).

Siguiendo el mismo esquema experimental se vio que el agregado de cAMP exógeno :

- previene la caída de los niveles internos de cAMP, que se observa en el pasaje de levadura a hifa en *M. racemosus* y *M. rouxii* (Larsen y Sypherd, 1974; Paveto *et al.*, 1975) ;

- no interfiere con el mantenimiento de un alto metabolismo fermentativo ni con el incremento de la capacidad respiratoria observados en las hifas aeróbicas formadas a partir de levadura en *M. racemosus* (Orlowski, 1991) ;

- previene el aumento en la síntesis de quitina y quitosano que se observa en el crecimiento polarizado en *M. racemosus* (Domek y Borgia, 1981).

En el segundo modelo experimental se adicionó cAMP a cultivos de esporas en germinación observándose que :

- se previene la emergencia del tubo germinativo en especies dimórficas como *M. rouxii* (Paveto *et al.*, 1975), y *M. racemosus* (Larsen y Sypherd, 1974) y monomórficas como *M. mucedo* y *M. hiemalis* (Jones y Bu'Lock, 1977) ;

- se aumenta la tasa de crecimiento esférico observado en las etapas tempranas de la germinación en *M. racemosus* (Wertman y Paznokas, 1981).

En ambos modelos experimentales altas concentraciones de cAMP se oponen al desarrollo de las hifas. Es posible que altos niveles de cAMP cumplan un rol similar tanto

en levaduras gemantes como en esporas en germinación aeróbica, inhibiendo el crecimiento polarizado (Orlowski, 1991).

MUCOR ROUXII COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA MORFOGENESIS

La capacidad de muchas especies de *Mucor* para desarrollar su crecimiento como micelio o levadura, según las condiciones ambientales y nutricionales las hace únicas entre los numerosos modelos microbianos utilizados para estudiar desarrollo y diferenciación, en las cuales una bifurcación en la secuencia morfogénica producida por factores críticos dirige al organismo hacia la construcción de una u otra morfología. Esta propiedad, junto con el hecho de que la variación en la síntesis, niveles y actividad de macromoléculas acompañan a la diferenciación citológica hace a la germinación de *Mucor* un modelo más válido para el estudio de morfogénesis en metafitos y metazoos que los sistemas más frecuentemente estudiados de esporulación en *Bacillus sp.* o *S. cerevisiae*. Dado que grandes poblaciones celulares pueden sufrir una rápida y sincrónica morfogénesis también lo hace más atractivo que otros sistemas eucariotes como *D. discoideum* o el nemátodo *C. elegans*, frecuentemente estudiados, en los cuales ocurre citodiferenciación pero donde la separación y recolección de líneas divergentes es trabajosa (Orlowski, 1991).

A partir de los estudios iniciales de Larsen y Sypherd sobre los efectos del cAMP en la transición levadura-micelio en *M. racemosus* y Passeron *et al.* en *M. rouxii*, numerosos grupos de investigación han enfocado su trabajo en la elucidación del rol del cAMP en la morfogénesis fúngica.

Las enzimas clave del metabolismo del cAMP han sido detectadas en una gran variedad de hongos estudiados (Rosenberg y Pall, 1978; Suoranta y Londesborough, 1984; Cooper *et al.*, 1985; Brunton y Gadd, 1989).

Se ha observado un rápido y transiente aumento del cAMP intracelular al inicio de la germinación en varias especies de Zygomycetes tales como *M. rouxii* (Cantore *et al.*, 1980), *Phycomyces blakesleanus* (Dewerchin y Van Laere, 1984), *Pilobolus longipes* (Bourret y Smith, 1987) y en ascosporas de *S. cerevisiae* (Beullens *et al.*, 1988).

En *M. rouxii* el aumento del cAMP al inicio de la germinación se acompaña con una concomitante elevación en los niveles de PDE y se ha propuesto a la fosforilación de PDE dependiente de PKA como el mecanismo para apagar la señal iniciada por el cAMP (Tomes y Moreno, 1990).

En *P. blakesleanus* una gran variedad de inductores de la germinación producen una transiente elevación del cAMP y una disminución de la actividad de la PDE (Van Laere, 1986a); enzimas tales como la trehalasa y la glicerol 3 fosfatasa son reguladas por fosforilación via PKA (Van Laere, 1986b).

El cAMP no degradado por la PDE es liberado al medio extracelular y se ha propuesto que, en *N. crassa*, puede cumplir un rol como sensor de la densidad del micelio (Shaw y Harding, 1987).

Todos estos datos sugieren que, a pesar de ser transiente, el incremento de cAMP induce la germinación de las esporas vía la fosforilación de proteínas celulares, siendo este nucleótido cíclico la señal que controla la liberación del estado durmiente de las mismas (Ishikawa, 1989).

En particular en *M. rouxii* además de las observaciones ya comentadas en párrafos anteriores se han reportado los siguientes resultados:

- Los niveles de cAMP medidos durante la germinación de las esporangiosporas suben rápidamente durante el crecimiento esférico, alcanzando un máximo en los primeros minutos, cuando las esporas están en un medio con glucosa (Tomes y Moreno, 1990), luego bajan permaneciendo así hasta la emergencia del tubo germinativo momento en el cual vuelven a subir hasta alcanzar los valores máximos iniciales permaneciendo elevados durante el desarrollo de las hifas. (Cantore *et al.*, 1980).

- Se han caracterizado bioquímicamente la PK dependiente de cAMP (Moreno y Passeron, 1980; Pastori *et al.*, 1985; Paveto *et al.*, 1989), la adenilato ciclasa (Cantore y Passeron, 1982) y la PDE de alta afinidad para cAMP (Galvagno *et al.*, 1979; Moreno *et al.*, 1982).

- Se han medido las actividades de adenilato ciclasa y PDE durante la germinación, tanto la adenilato ciclasa como la PDE tienen su valor máximo en esporas, disminuyendo luego. La adenilato ciclasa vuelve a subir luego de la emisión del tubo germinativo hasta un 80% de su valor máximo, mientras que la PDE permanece entre un 40 y un 50% de los valores iniciales durante todo el proceso de germinación (Cantore *et al.*, 1980).

- Simultáneamente con el desarrollo de esta tesis Rossi y Moreno (1990) han medido la actividad de PKA durante la germinación, tanto de la subunidad catalítica C, como de la subunidad regulatoria R, encontrándose que la PKA se activa muy pronto de comenzada la germinación por el pico transiente de cAMP y como consecuencia la

subunidad C sufre una disminución regulada. Esta activación temprana sugiere fuertemente un rol para la PKA al comienzo de la germinación. Los niveles permanecen bajos hasta poco antes de la emisión del tubo germinativo en que ambas subunidades suben, permaneciendo altas durante el crecimiento de las hifas.

El conocimiento del sistema enzimático relacionado con el cAMP y sus variaciones durante la germinación, provee una base sólida para encarar el estudio del mecanismo por el cual el cAMP puede influir la morfogénesis en *Mucor rouxii*.

MATERIALES Y METODOS

PREPARACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

ORGANISMO UTILIZADO

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

OBTENCION DE ESPORAS Y MANTENIMIENTO DE LA CEPA

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

CULTIVOS

Las esporas fueron inoculadas a 10^4 o 10^5 esp/ml, previo recuento en cámara de Neubauer; el volumen de cultivo utilizado fue de 4 ml para observaciones microscópicas, 40 ml para determinaciones de peso seco y proteínas y 100-500 ml para determinaciones enzimáticas.

Se utilizaron los siguientes medios: medio definido que consiste en una solución de sales minerales suplementadas con vitaminas (Bartnicki-García et al., 1962) y 2% de glucosa (DMG) o 2% de maltosa (DMM) como fuentes de carbono; medio definido con 2% glucosa y 0,2% de casaminoácidos (DMCG) y medio complejo con 0,3% de extracto de levadura, 1% de peptona, 3% de glucosa (YPG) (Bartnicki-García et al., 1962). Los diferentes compuestos agregados fueron disueltos en agua estéril a concentraciones 10 veces superiores a las utilizadas en los cultivos y esterilizadas por filtración previamente a su agregado. Los erlenmeyers fueron incubados en un agitador rotatorio a 100 rpm y a 28°C por períodos variables de tiempo.

Los cultivos anaeróbicos se desarrollaron en frascos cerrados con flujo continuo de 100% de CO₂.

PREPARACION DE CELULAS PERMEABILIZADAS

La permeabilización se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Maggese et al., (1982). Las células provenientes de cultivos incubados 7 hs fueron centrifugadas y resuspendidas en buffer de permeabilización a una concentración de $0,5-2 \times 10^9$ cel/ml, se les agregó 150 μ l de una mezcla de tolueno:etanol (1:4) y se agitaron durante 5 min

en agitador rotatorio; luego se mantuvieron en hielo durante 1 min y se lavaron 3 veces con el mismo buffer.

Cuando la preparación se utilizó para la determinación de PKA las células fueron utilizadas dentro de la hora de realizado el tratamiento de permeabilización; se verificó la eficiencia de permeabilización por tinción con el colorante Trypan Blue. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry como se detalla en determinación de parámetros de crecimiento. Cuando la preparación se utilizó para tinción con FITC-faloidina los lavados se realizaron en buffer PBS.

OBTENCION DE PAREDES

Setecientos ml de cultivos inoculados a 1×10^6 esporas/ml, con o sin el agregado de 150 μ M de dbcAMP, incubados por diferentes períodos de tiempo fueron filtrados y lavados con agua destilada. Las células filtradas se colocaron en un tubo con perlas de vidrio de 400-660 μ m de diámetro y fueron sometidas a dos ciclos de agitación, de 30 seg cada uno, en agitador rotatorio, con un intervalo de 30 seg en hielo, para obtener la ruptura celular; se observaron al microscopio, para asegurar que los cuerpos celulares se hubieran roto pero las paredes permanecieran intactas, y se lavaron 5 veces con agua destilada, centrifugando luego a 3500 rpm durante 5 minutos.

DETERMINACION DE PARAMETROS DE CRECIMIENTO

PESO SECO

Los cultivos fueron filtrados utilizando papel de nitrocelulosa de 0,45 μ m previamente tarados, lavados exhaustivamente con agua destilada y secados a 90° C hasta peso constante.

PROTEINAS

Las proteínas se determinaron a partir de las muestras llevadas a sequedad, por el método de Lowry *et al.*, (1951), luego de solubilizarlas en NaOH 1N durante 1 hora a 100° C, utilizando sero albúmina bovina como patrón.

DNA

El DNA se determinó a partir de las muestras llevadas a sequedad por el método de Cattolico y Gibbs (1975), utilizando DNA de esperma de arenque como patrón, y ácido diamino benzoico (DABA) como compuesto fluorescente.

Los cultivos se filtraron a través de nitrocelulosa de 0,45 μm , se lavaron exhaustivamente con agua destilada y se llevaron a sequedad. Sobre las muestras secas, que permanecían en los filtros, se realizaron los siguientes lavados de 150 μl cada uno : 2 lavados, a 5° C, con TCA 10%; 2 lavados, a 5° C, con etanol : agua (2 : 1) y finalmente 2 lavados, a 60° C, con etanol : agua (2 : 1), dejando secar las muestras entre cada lavado.

Una vez secas, las muestras fueron colocadas en un tubo de hemólisis, removiendo el filtro y se agregaron 200 μl de una solución de DABA 0,4 g/ml, incubando durante 45 min a 55° C. Se realizó el mismo procedimiento con una curva patrón de DNA. Las lecturas se efectuaron por duplicado, con las muestras tal cual y diluidas al medio y al cuarto.

OBSERVACIONES MICROSCOPICAS

MICROSCOPIA OPTICA

Las muestras de los cultivos fueron fijadas con solución diluida de formaldehído y observadas al microscopio óptico, tomándose fotografías representativas, que fueron utilizadas para las determinaciones morfométricas.

En algunos casos las mediciones se realizaron directamente sobre los preparados observados, utilizando un ocular graduado, y luego sobre las fotografías, obteniéndose los mismos resultados por los dos métodos.

Las morfologías fueron clasificadas como sigue: M, cuando las células germinaban dando el típico micelio; P, cuando el efecto sobre la morfología fue parcial y se observaban células con hifas cortas y deformes, de puntas hinchadas y redondeadas, células madre hinchadas con hifas hinchadas y formas consistentes en células redondeadas unidas en cadenas; T, cuando toda la población consistía en células esféricas sin brotes. Se contaron aproximadamente 100 células en cada experimento.

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Tinción de núcleos con DAPI

La tinción de núcleos se realizó con 4,6-diamino-2 fenil indol (DAPI), según Butt *et al.*, (1989). Alícuotas de 200 μ l de los cultivos se centrifugaron 5 min a 1000 rpm en una microcentrífuga. El precipitado se resuspendió en 50 μ l del sobrenadante y se procedió a la fijación de las células con etanol 70%.

Las células fijadas se lavaron 2 veces con agua destilada, centrifugando cada vez y finalmente se resuspendieron en un volumen de 20 μ l al cual se agregó 100 μ l de una solución de DAPI 0,5 μ g/ml, incubando durante 10 min.

Se efectuaron 3 lavados sucesivos con agua destilada, volviendo a resuspender las células en un volumen final de 20 μ l. Los núcleos teñidos se visualizaron observando las muestras en un microscopio de epifluorescencia.

Las determinaciones se realizaron contando directamente los núcleos que se observaban en los preparados variando el plano focal, y tomando fotografías que luego fueron cuantificadas. Ambos métodos arrojaron los mismos resultados.

Tinción de F-actina con FITC-faloidina

Veinte ml de cultivos celulares, inoculados a 10^6 esp/ml y crecidos 7 hs con o sin el agregado de 150 μ M de dbcAMP fueron fijados en el mismo medio de cultivo con formaldehído a una concentración final de 4%. Las células se incubaron 1h a temperatura ambiente, luego se lavaron 3 veces con buffer PBS, se centrifugaron y fueron resuspendidas en 1 ml de buffer de permeabilización como se detalla en preparación de células permeabilizadas.

Una vez concluida la permeabilización las células se resuspendieron en un volumen final de 300 μ l en PBS adicionado con 1mg/ml de albúmina y se incubaron 20 min en oscuridad con 150 μ l de solución de FITC-faloidina 0,2mg/ml. Una vez finalizada la incubación se lavaron 3 veces con buffer PBS, manteniéndolas en oscuridad.

Las células teñidas se observaron en un microscopio de epifluorescencia tomándose fotografías de los preparados representativos.

Tinción de células con FITC-concanavalina A

Un ml de cultivos celulares inoculados a 10^5 esp/ml y crecidos 30 hs con o sin el agregado de 300 μ M de dbcAMP fueron centrifugados y lavados 3 veces con buffer

PBS. Luego del lavado las células se resuspendieron en 1 ml de solución de FITC-concanavalina A 0,5 mg/ml en buffer Con A, se incubaron en oscuridad, con agitación continua durante 1 h. Al finalizar la incubación las células se lavaron 6 veces con buffer PBS, manteniéndolas en oscuridad.

Las células teñidas se observaron en un microscopio de epifluorescencia, tomándose fotografías de los preparados representativos.

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Veinte ml de cultivos celulares, crecidos durante diferentes períodos de tiempo, con o sin el agregado de 150 μ M de dbcAMP, fueron procesados según las técnicas que se detallan a continuación, con el objeto de hallar las condiciones óptimas de fijación que aseguraran la preservación de la ultraestructura celular.

Fijación

Técnica 1)

Al final del período de incubación las células fueron fijadas agregando un volumen igual de buffer cacodilato 0,1 M, pH 7,2 que contenía 2% de glutaraldehído y 2% de formaldehído, preparado fresco a partir de paraformaldehído, la suspensión se agitó suavemente y se dejó 15 min a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se centrifugó a 500xg durante 2 min y el precipitado se resuspendió en 1 ml de buffer de Karnovsky, incubándose 3 hs más, a temperatura ambiente; luego fueron nuevamente centrifugadas y lavadas 10 veces con buffer cacodilato.

Técnica 2)

Otra técnica fue decantar las células, eliminar el sobrenadante, dejando 1 ml de medio de cultivo al cual se le agregó buffer cacodilato 0,1 M, pH 7,2 con glutaraldehído 3% ; la suspensión se agitó suavemente y se dejó 15 min a temperatura ambiente. Todas las concentraciones de células se hicieron por decantación, sin centrifugar, procediéndose como se describió antes pero sin formaldehído.

Técnica 3)

El cultivo fue concentrado por decantación y se le agregó un volumen igual de buffer PBS pH 7, adicionado con formaldehído 4% (concentración final) y manitol 1M o MgSO₄ 0,6 M (concentración final), como estabilizantes osmóticos. Se incubó 15-30 min a 29° C en agitador rotatorio a 100 rpm. Se decantaron las células y se realizó una

segunda fijación con formaldehído 2% en PBS pH 7, 2-3 horas a temperatura ambiente, sin agitación. Se lavaron las células 3 veces, de 5 minutos cada una, con PBS. Todas las incubaciones y lavados se realizaron con estabilizante osmótico.

Técnica 4)

Es una variante de la técnica 3) en la cual las concentraciones de células se realizaron por succión suave, con una bomba de vacío, recogiendo las células en filtros de nitrocelulosa. El tratamiento prosiguió como en 3) utilizando MgSO₄ 0,6 M como estabilizante osmótico.

Las paredes celulares, obtenidas como se detalla en obtención de paredes, se sometieron a la técnica de fijación 4), resuspendiendo las paredes filtradas en PBS y agregando las diferentes concentraciones de formaldehído.

Las técnicas 1) y 2) son modificaciones de las informadas por Obregón *et al.*, (1990), mientras que las 3) y 4) están basadas en técnicas de microscopía electrónica descritas por Hayat (1986) y en comunicaciones personales de la Dra Hortensia Rico, de la Universidad de Valencia, España.

Post fijación con tetróxido de osmio

Una vez que las células estaban fijadas, por alguna de las 4 técnicas, se incubaron con tetróxido de osmio 2% en buffer cacodilato 3 hs a temperatura ambiente, en oscuridad, para las técnicas 1) y 2) y 1% de tetróxido de osmio en PBS, 1 h en oscuridad, para las técnicas 3) y 4), procediéndose luego a los lavados correspondientes.

Tratamiento con metaperiodato

Las células provenientes de las técnicas 3) y 4) y las paredes celulares provenientes de de 4) se incubaron con 3 ml de metaperiodato de sodio, preparado en el momento, (100 mg en 10 ml), durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavó una vez con PBS.

Tratamiento con cloruro de amonio

Nuevamente las células provenientes de las técnicas 3) y 4) y las paredes celulares provenientes de 4) se incubaron con 3 ml de solución de cloruro de amonio,

preparada en el momento (60 mg en 10 ml), durante 30 min a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados de 5 min cada uno con PBS.

En todos los casos hasta la inclusión en agar se observaban las células al microscopio óptico luego de cada paso de los tratamientos, para observar si se habían producido alteraciones.

Inclusión en agar

Se colocaron los preparados en un tubo cónico, se eliminó el sobrenadante, y se agregaron 3 ml de una solución tibia de agar bacteriológico N 1 (0,5 g en 100 ml de agua destilada). Se centrifugó 5 min, se pusieron los tubos en hielo, se separó con espátula la masa solidificada y se procedió a cortar la parte que contenía los preparados en pequeños trozos, para someterlos a la deshidratación.

Deshidratación

Los preparados fueron deshidratados por incubación con soluciones cada vez más concentradas de etanol desde 50 a 100%.

Inclusión en la resina

Los preparados provenientes de las técnicas 1) y 2) se incluyeron en resina Spurr, mientras que las de 3) y 4) se incluyeron en L.R. White.

Tratamiento con uranilo y citrato de plomo

Secciones finas (650-750 Å) fueron teñidas con acetato de uranilo al 2%, lavadas con agua destilada y contrastadas con solución de citrato de plomo, lavadas con solución de NaOH al 0,02%, por 20 segundos, luego con agua destilada y secadas.

Observación de los preparados

Las grillas tratadas con resina Formvar y carbón fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión y se tomaron fotografías de los preparados representativos.

PREPARACIONES ENZIMATICAS

PREPARACION DE EXTRACTOS CRUDOS PARA MEDICIÓN DE PKA

Los cultivos inoculados a 1×10^6 esp/ml en los medios que se detallan en cada caso, fueron cosechados a los diferentes tiempos de crecimiento, de modo tal de obtener aproximadamente el mismo peso húmedo en todos los casos. El tiempo cero correspondió a una cantidad equivalente de esporas tomada directamente de la solución concentrada, en agua destilada estéril. Fueron filtrados utilizando nitrocelulosa de 0,45 μm , lavados con agua destilada fría y procesados inmediatamente.

Los extractos se prepararon a partir de los filtrados, agregándoles 1,2 gr de perlas de vidrio (460-600 μm de diámetro). 0,6 ml de buffer de extracción y agitando, con agitador rotatorio, tres veces durante 1 min cada vez, dejando reposar en hielo durante 15 seg, entre cada extracción. Estos preparados fueron utilizados en el momento de ser obtenidos.

Cuando los filtrados provenían de cultivos control de más de 7 hs de crecimiento la extracción se realizó moliendo en mortero con igual masa de arena, hasta la obtención de una pasta húmeda, luego se recogió con buffer GB y se agitó suavemente con agitador magnético a 4° C, durante 20 min. El sobrenadante de esta preparación fue utilizado inmediatamente.

PREPARACION DE PKA PARCIALMENTE PURIFICADA

Los inóculos fueron de 5×10^5 esp/ml en medio YPG. Una preparación típica comprende 500 ml de medio de cultivo en Erlenmeyers de 2 l. Luego de 14-16 hs de crecimiento (fase logarítmica), los cultivos fueron cosechados por filtración a través de papel Whatman N 1, lavados exhaustivamente con agua destilada fría y molidos con N_2 líquido, hasta obtener un polvo fino que fue procesado inmediatamente. Se obtuvieron en general 5 gr de micelio a partir de 500 ml de medio. Todos los pasos que se detallan se realizaron a 4° C.

El polvo de micelio se extrajo con dos volúmenes de buffer GB, con agitación suave durante 20 min. Se centrifugó a 10.000 rpm (15.000xg) durante 30 min. El sobrenadante (S10) fue cromatografiado en una columna de DEAE-Sepharosa en una relación de 20 mg de proteína por ml de resina.

La columna fue lavada con dos volúmenes de buffer GB y eluida con dos concentraciones de NaCl en GB, 0,12 y 0,35 M, dos volúmenes en cada caso; se tomó la fracción correspondiente a 0,35 M de NaCl, la cual fue precipitada con sulfato de amonio 80% de saturación. En este paso la enzima fue guardada en alícuotas a -20 °C.

En algunos casos que se detallan, los filtrados provenientes de cultivos en diferentes medios y tiempos de incubación no fueron concentrados por sulfato de amonio sino que fueron ensayados directamente tal como se obtuvieron de la columna.

PREPARACION DE PKA POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE SACAROSA

Se prepararon gradientes lineales 5-20% de sacarosa, en buffer GB, superponiendo 7 capas de 650 µl cada una; se dejaron a temperatura ambiente durante 2 hs, se enfriaron a 4 °C y se sembraron inmediatamente con extractos provenientes de diferentes cultivos. Las muestras sembradas contenían entre 300 y 600 µg de proteína. en un volumen de 200 µl. Se centrifugaron durante 15 hs a 4° C en un rotor SW 55 Ti Beckman, a 35000 rpm.

Los gradientes se fraccionaron desde el fondo hasta la superficie haciendo sifón en 22- 25 fracciones de aproximadamente 200 µl; alícuotas de estas fracciones fueron utilizadas para medir actividad de PKA y para actividad ligante de cAMP.

Se usaron como marcadores catalasa (11,3 S), peroxidasa (3,5 S) y citocromo c (1,7 S).

PREPARACION DE PDE PARCIALMENTE PURIFICADA

El sobrenadante S10 obtenido como se describe en preparación de PKA parcialmente purificada se cargó en una resina DEAE-Sepharosa, equilibrada con buffer GB en una relación de 50 mg de proteína/ml de resina, agitando suavemente con agitador magnético, durante 30 min, a 4° C. Se filtró por Büchner y se lavó con 3 volúmenes de NaCl 0,12 M en GB, durante 15 min, con agitación suave. La resina se recogió nuevamente por filtración y la fracción con actividad fosfodiesterasa se eluyó poniéndola en contacto con dos volúmenes de NaCl 0,25 M en GB, durante 15 min, con agitación suave. Esta fracción se concentró con sulfato de amonio 80% de saturación. Se fraccionó en alícuotas y se congeló a - 70 °C.

ENSAYOS ENZIMATICOS

ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE PKA

Medición de actividad de holoenzima proveniente de extractos crudos

La holoenzima fue determinada ensayando su actividad fosfotransferasa, utilizando kemptido como sustrato. Se realizó una incubación previa con solución de carbón 50 mg/ml en buffer de extracción para eliminar las posibles interferencias que los análogos de cAMP pudieran introducir en el ensayo. Cien μl de extracto se incubaron con 10 μl de solución de carbón, durante 5 min en hielo, luego se centrifugó 1 min a 10000 rpm en microcentrífuga y se determinó actividad fosfotransferasa en el sobrenadante.

Las muestras fueron diluidas apropiadamente en buffer de dilución hasta obtener una concentración proteica final de 2-4 μg en los 70 μl de incubación. La mezcla de incubación contenía 50 mM de fosfato de potasio pH 6,8, kemptido 75 μM , [γ - ^{32}P]ATP 0,1 mM (1300 cpm/pmol), EGTA 0,5 mM, EDTA 0,1 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, MgCl_2 10 mM y cuando correspondía cAMP 10 μM . Luego de incubar 10 min a 30° C las reacciones se detuvieron sembrando 50 μl en papeles de fosfocelulosa (Whatman P-81) de 2x2 cm, que fueron sumergidos en ácido fosfórico 75 mM, y lavados 3 veces, 5 min cada vez, con el mismo ácido y una última vez con etanol (Roskoski, 1983) Los papeles fueron secados y se determinó la radiactividad en solución centelleadora de tolueno.

Todos los ensayos fueron hechos por cuadruplicado y se usaron además muestras de tres experimentos independientes en los cuales se utilizaron para la germinación, esporas provenientes de diferentes preparaciones.

Se definió unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 nmol de fosfato a kemptido en 10 min a 30° C.

Medición de actividad de holoenzima parcialmente purificada

La medición de actividad se realizó utilizando kemptido como sustrato. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 70 μl conteniendo buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 , 2-mercaptoetanol 2 mM, MgCl_2 10 mM, [γ ^{32}P] ATP 50 μM (300-1000 cpm/pmol), kemptido 63 μM , la enzima y cuando correspondió cAMP 10 μM . La reacción

fue incubada durante 10 min a 30° C; alícuotas de esta mezcla de reacción fueron procesadas en papeles de fosfocelulosa como en el ítem anterior.

Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y se repitieron según el esquema detallado en el ítem anterior.

Medición de actividad de holoenzima en células permeabilizadas

La medición de actividad se realizó en alícuotas conteniendo 2×10^6 células, la mezcla de reacción fue similar a la descrita en el ítem anterior, el tiempo de incubación fue de 2 min a 30° C. Terminada la incubación se agregó seroalbúmina bovina a una concentración final de 10 mg/ml, se hirvió durante 30 seg y se centrifugó inmediatamente. Se sembraron alícuotas de los sobrenadantes en papeles de fosfocelulosa como se ha descrito en párrafos anteriores.

MEDICION DE ACTIVIDAD LIGANTE DE cAMP

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

En los casos en que se trabajó con extractos crudos se realizó una incubación previa con solución de carbón. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

MEDICION DE ACTIVIDAD DE FOSFODIESTERASA

Se siguió el método en dos pasos modificado por Thompson *et al.*, (1976), en la mezcla habitual de ensayo descrita por Kerner *et al.*, (1984), conteniendo buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, 2-mercaptoetanol 2 mM, 50 μ g seroalbúmina bovina, MgCl₂ 10 mM, [3 H]cAMP 0,1, 1 o 5 μ M según se indique, y la enzima en un volumen final de 0,1 ml. La mezcla se incubó a 30° C durante 20 min, la reacción se detuvo por calentamiento a 100° C durante 1 min. Después de enfriar se agregaron 50 μ g de veneno de serpiente (*Ophiophagus hannah*), se incubó por 10 min a 30° C y se agregó 1,1 ml de una suspensión de Dowex AG1-X2 en metanol 50% (1:2). Luego de dejar 15 min en frío, se

centrifugaron los tubos de reacción y se ensayó la radiactividad en 0,5 ml del sobrenadante en mezcla centelleadora de Arkopal-tolueno.

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

Se definió como una unidad enzimática a la cantidad de muestra que cataliza la hidrólisis de 1 pmol de cAMP/min en las condiciones habituales de ensayo.

OTRAS DETERMINACIONES

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE cAMP

Obtención de las muestras

Para las determinaciones intracelulares, muestras de cultivos de diferentes tiempos de incubación, conteniendo un total de 4×10^6 células fueron filtradas a través de nitrocelulosa y lavadas con agua destilada. Los filtros, que contenían las células fueron rápidamente sumergidos en HCl 0,1 N, sometidos a tres ciclos de congelado y descongelado en N₂ líquido, seguidos por centrifugación a 10.000xg por 30 seg. El sobrenadante se guardó fraccionado a - 70° C.

Para las determinaciones extracelulares, alícuotas de 1 ml de los medios de cultivo correspondientes a los diferentes tiempos de incubación fueron llevados a una concentración de HCl de 0,1 N y hervidos por 3 min. Las muestras se guardaron a - 70°C.

Purificación del cAMP

El cAMP fue separado de sus butiril derivados por medio de una doble cromatografía a través de Dowex 50W-X4 como se describe en Hsie *et al* (1975).

El proceso de purificación se aplicó a las muestras control y tratadas, tanto intra como extracelulares. La recuperación, generalmente 30-50% se siguió con un trazador radiactivo, se agregaron 2 µl de [³H]cAMP (actividad específica 30 Ci/mmol), por cada ml de muestra, al comienzo de la purificación. Con estos datos se corrigieron las mediciones experimentales.

Dosaje del cAMP

Las determinaciones se realizaron por radioinmunoensayo. El método consiste en competir la unión del [125 I]cAMP a anticuerpos específicos, con cantidades variables de cAMP frío.

Las muestras fueron acetiladas y el cAMP unido al anticuerpo se separó del nucleótido libre, precipitando el primero con etanol 95%, a temperatura ambiente durante 5 min, según la técnica descrita por Steiner *et al.*, (1972).

Se confeccionó una curva standard con cAMP frío variando la concentración de 19 a 5000 fmoles.

DETERMINACION DE PROTEINAS

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

La proteína celular total se determinó por el método de Lowry, como se describe en el ítem determinación de parámetros de crecimiento.

OTRAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Peroxidasa

Se siguió la técnica descrita en el manual de Worthington (1972), midiendo colorimétricamente el producto de oxidación de la o-dianisidina por agua oxigenada en presencia de la enzima.

Catalasa

Se midió la actividad enzimática valorando el sustrato no consumido (agua oxigenada) con solución de KI, de acuerdo al método de Terenzi *et al.*, (1971).

Citocromo C

Se valoró por espectrofotometría en el visible, midiendo la absorbancia a 410 nm.

MEDICION DE LA RADIATIVIDAD

Radiación beta

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

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

Radiación Gamma

Se utilizó un contador gamma de pozo, en ausencia de solución centelleadora.

BUFFERS

Buffer GB: Tris-HCl 10 mM, pH7,4
2-mercaptoetanol 10mM
EDTA 1mM
EGTA 1 mM
p-metil- sulfonil fluoruro 0,5 mM

Buffer de extracción

K₂HPO₄-KH₂PO₄ 50 mM, pH 6,8
EDTA 5 mM
EGTA 3 mM
NaCl 120 mM
2-mercaptoetanol 10 mM
p-metilsulfonilfluoruro 1mM
antipaina 3 µg/ml
benzamidina 1 mM

Buffer de dilución

K₂HPO₄-KH₂PO₄ 50 mM,pH 6,8
EDTA 5 mM
EGTA 3 mM

2-mercaptoetanol 10 mM
Seroalbúmina bovina 0,9 mg/ml

Buffer de permeabilización

Tris HCl 50 mM, pH 7,4
EGTA 1mM
EDTA 3mM
2-mercaptoetanol 10mM
benzamidina 1mM
p-metilsulfonilfluoruro 1 mM

Buffer PBS

NaH₂PO₄.H₂O 0,257 g/l
Na₂HPO₄.2 H₂O 2,5 g/l
NaCl 8,77 g/l

Buffer Con A

Tris HCl 1M pH 7,5
KCL 0,6M
NaCl 0,5M
MnCl₂ 2mM
MgCl₂ 2mM
CaCl₂ 2mM

REACTIVOS

El [³H]cAMP (Actividad específica 30 Ci/mmol), y el [γ -³²P]ATP fueron de New England Corp.

El [¹²⁵I]cAMP fue cedido generosamente por el Dr E. Charreau (IBYME, Buenos Aires).

El anticuerpo policlonal, en conejo, anticAMP fue de Chemicon International Inc.

Los análogos de cAMP, los nucleótidos, la papaverina, la isobutil metil xantina (IBMX), la teofilina, el dipiridamol, las resinas de intercambio DEAE-Sepharosa, Dowex 1 AX 2, Dowex 50W X4, los inhibidores de proteasas, el veneno de serpiente

(*Ophiophagus hannah*), la seroalbúmina bovina cristalina fracción V (BSA), el Tris, la sacarosa, el EDTA, el EGTA, el PPO, el dimetil POPOP, las perlas de vidrio, el 2-mercaptoetanol, la citocalasina A, la FITC-faloidina, la FITC-concanavalina A, el DAPI, el glutaraldehído, el para -formaldehído y la resina Spurr fueron de Sigma Chemical Co.

(3(2H)- pyridazinona,4,5-dihidro-6-[4-(1H-imidazol-1-il)fenil-5-metil .HCl) (CI-930) fue donado por Warner Lambert Co, Ann Arbor, Michigan, USA.

(1 etil-4-(etiltio)-1H-pirazolo[3,4-b]-piridina-5-ácido carboxílico etil éster) SQ-65442 fue gentilmente suministrado por E.R. Squibb e Hijos, Princeton, N.J. USA.

((8R*,9S*,11S*)-(-)9-hidroxi-9-n-hexilcarbonil-8-metil-2,3,9,10-tetrahidro-8,11 epoxi-1H,8H,11H-2,7b,11a-triazodibenzo(a,g)cicloocta(cde)triden-1-ona) (KT-5720) y (N-[2-(p-bromo-cinamilamino)etil]-5-isoquinolina sulfonamida) HCl (H-89); el péptido inhibidor de PKA (PKI) miristoilado fueron obtenidos de BioMol Research Laboratories, Inc.

La resina LR White fue de London Resin Company Ltd.

Las fotografías de microscopía óptica se tomaron con Kodak Plus de 125 ASA .

Las fotografías de microscopía de fluorescencia se tomaron con Kodak Tri X Pan de 400 ASA.

Las fotografías de microscopía electrónica fueron tomadas con Kodak Electron Image Film SO-163.

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

El papel de fosfocelulosa fue Whatman P-81.

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

El Arkopal N100 fue donado por Química Hoechst.

El resto de los reactivos fue de grado analítico.

RESULTADOS Y DISCUSION

EFFECTO DEL DIBUTIRIL cAMP SOBRE MORFOLOGIA Y CRECIMIENTO

EFFECTOS SOBRE MORFOLOGIA

El estudio de la vía de transducción de señales por cAMP y su rol en la morfogénesis nos ha llevado a estudiar en profundidad los efectos del dbcAMP sobre la germinación de las esporangioesporas de *M. rouxii*. Varios estudios previos han mencionado la capacidad del dbcAMP de bloquear el desarrollo de las hifas en especies dimórficas y monomórficas de *Mucor* (Jones y Bu'Lock, 1977; Orłowski, 1979, 1980; Wertman y Paznokas, 1981) pero el efecto no fue analizado en detalle.

Observamos que al agregar dbcAMP a esporas de *M. rouxii* en germinación se inhibía la emisión del tubo germinativo, en forma dosis dependiente; las células aumentaban de volumen y las hifas se deformaban y engrosaban a aquellas concentraciones del análogo que no producían inhibición total.

El grado de efecto del dbcAMP sobre la morfología de las esporas depende de varios parámetros tales como la temperatura de incubación, la densidad del inóculo, y el tiempo de adición del nucleótido cíclico.

El rango de temperaturas estudiadas fue entre 26 y 32° C; a 26° C ambos cultivos crecían con dificultad, entre 30 y 32° C se veía favorecido el crecimiento isodiamétrico pero se inhibía el crecimiento control; finalmente a 28° C ambos cultivos crecían sin alteraciones; por lo tanto se seleccionó ésta como la temperatura de trabajo.

Estudiamos el efecto de concentraciones variables de dbcAMP sobre morfología y crecimiento a dos densidades celulares diferentes. En la Fig.1 pueden observarse imágenes representativas de morfología normal (M) (Fig.1A), efectos parciales (P) (Fig.1B) y efecto total (T), obtenidas con 10^6 esporas/ml (Fig.1C) y 10^4 esporas/ml (Fig.1E).

Se consideró efecto total cuando el cultivo estaba formado exclusivamente por células redondas, ya que esta morfología fue la obtenida cuando se incrementó la concentración de análogo. En todos los casos el número de cuerpos celulares independientes nunca superó el inóculo inicial, sugiriendo que no había formación de nuevas células cuando se incubaba con dbcAMP.

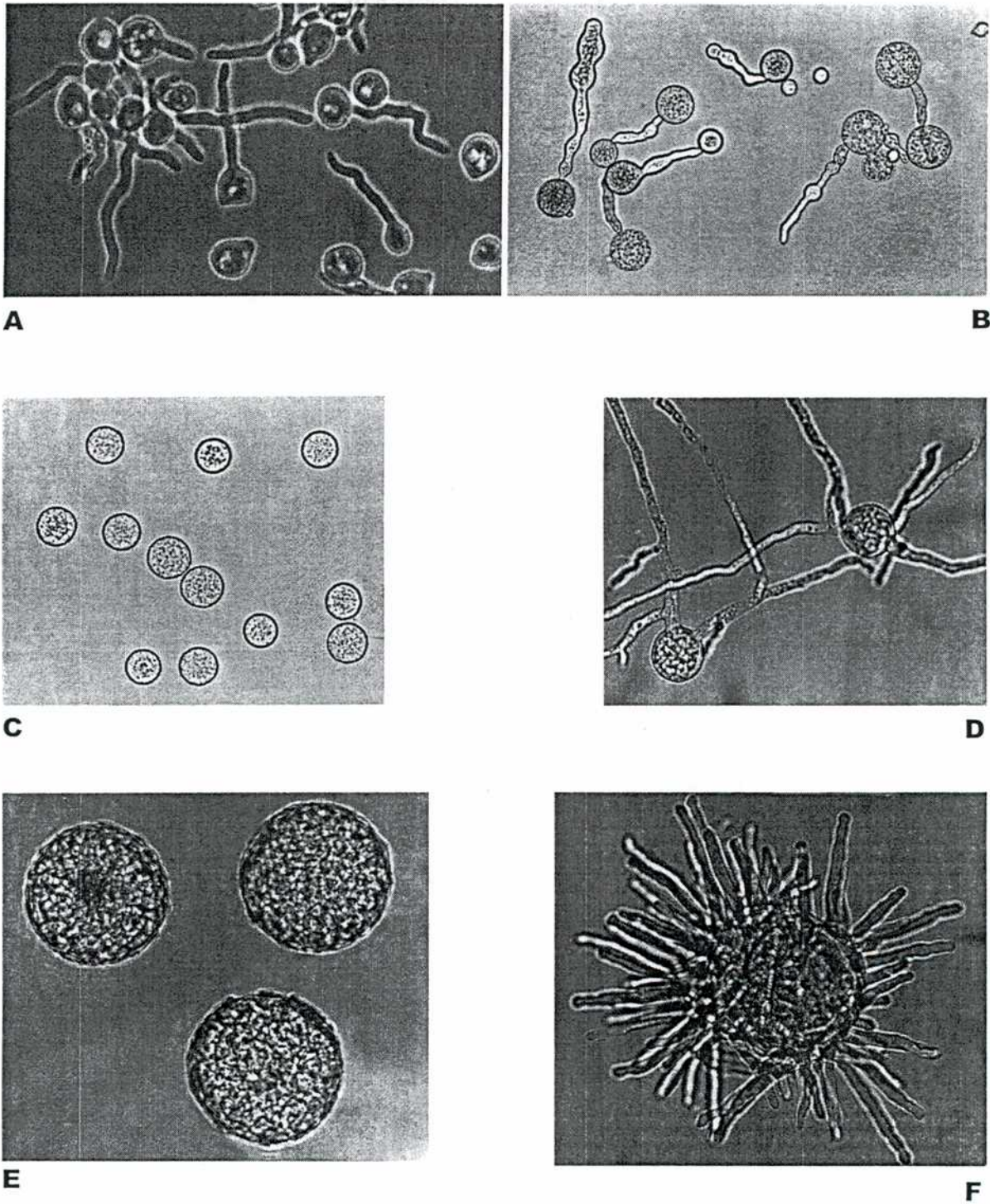


Figura 1- Morfología de *Mucor rouxii* bajo diferentes condiciones de cultivo. A- Medio DMG control sin agregados, 7 hs de cultivo. **B-** 50 μM dbcAMP, 10^6 esporas/ml, 16 hs de cultivo o 150 μM dbcAMP, 10^7 esporas/ml, 16 hs de cultivo. **C-** 150 μM dbcAMP, 10^5 esporas/ml, 16 hs de cultivo. **D-** Cultivo con 150 μM dbcAMP, 10^6 esporas/ml, 16 hs de cultivo, filtrado, resuspendido en el mismo volumen de medio fresco sin agregados y cultivado 5 hs más. **E-** 500 μM dbcAMP, 10^4 esporas/ml, 40 hs de cultivo. **F-** Cultivo con 500 μM dbcAMP, 10^4 esporas/ml, 40 hs de cultivo, filtrado, resuspendido en el mismo volumen de medio fresco sin agregados y cultivado 5 hs más. **Aumento** : A 1cm=14 μm B, C, D y F 1cm=28 μm .

Los resultados de la Tabla 1 muestran que la concentración de dbcAMP necesaria para obtener efecto total fue de 150 μ M, con inóculos de 10⁶ esporas/ml, mientras que con 10⁴ esporas/ml se necesitaron concentraciones mayores (aprox. 500 μ M), para obtener el mismo efecto.

CURVAS DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE dbcAMP

Para estudiar detalladamente el efecto del dbcAMP sobre el crecimiento se construyeron curvas con cultivos de 10⁶ y 10⁴ esporas/ml, en presencia o ausencia de dbcAMP (Fig 2A y B). La Fig 2A muestra que para los cultivos de 10⁶ esporas/ml la velocidad de crecimiento es aproximadamente la misma, hasta las 12 hs de cultivo, con o sin el agregado de 150 μ M del análogo. El crecimiento, en presencia de dbAMPc, se detiene antes, aproximadamente a las 20 hs.

La Fig. 2B muestra que las curvas de crecimiento para cultivos de 10⁴ esporas/ml en ausencia o en presencia de 150 y 500 μ M de dbcAMP comienzan a diverger alrededor de las 25 hs de cultivo, alcanzándose la meseta antes en presencia del análogo y que el efecto inhibitorio sobre el crecimiento es mayor cuanto mayor es la concentración de dbcAMP.

La biomasa obtenida en la fase estacionaria de ambos cultivos control es la misma, y la velocidad de crecimiento, estimada por la pendiente de las curvas en la etapa logarítmica, también es similar.

El siguiente experimento se realizó para dilucidar si la meseta observada en presencia de dbcAMP se debía al agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo, a la muerte celular, o a que se había llegado a un volumen crítico para las células. También se deseaba saber si el efecto era reversible. En los tiempos indicados con las flechas para ambas figuras, se filtraron y resuspendieron en medio fresco 4 ml de cultivo, sin o con 150 μ M de dbcAMP (Fig 2A) o 500 μ M de dbcAMP (Fig 2B).

En todos los casos el crecimiento, medido como un incremento del peso seco, se reanudó, indicando que la meseta era una consecuencia del agotamiento del medio de incubación. El volumen celular, tanto de los cultivos de 10⁴ como de 10⁶ esporas/ml, se incrementó, indicando que no se había llegado a un volumen crítico.

Tabla 1- Efecto de concentraciones variable de dbcAMP sobre crecimiento y morfología

dbcAMP ^a (μ M)	Peso seco ^b (% control)		Morfología ^c
	16 h	40 h	
10⁶ esporas/ml			
1	105	96	M
10	87	62	M
50	76	42	P
100	75	ND	P
150	81	40	T ^d
500	72	40	T ^d
1000	71	ND	T ^d
10⁴ esporas/ml			
1	111	105	M
50	115	70	P
150	110	56	P
500	68	32	T ^d
1000	57	30	T ^d

^a Las concentraciones de dbcAMP indicadas fueron agregadas al medio de cultivo antes del inóculo

^b Los valores de 100% para 4 ml de los cultivos de 16 y 40 hs fueron 4 y 9,2 mg respectivamente para inóculos de 10⁶ esporas/ml y 0,35 y 6,2 mg para inóculos de 10⁴ esporas /ml

^c El tipo de morfología indicado pudo observarse tanto a las 16 como a las 40 hs.

^d Un efecto total sobre la morfología pudo anticiparse por observación del cultivo a las 8 hs de crecimiento.

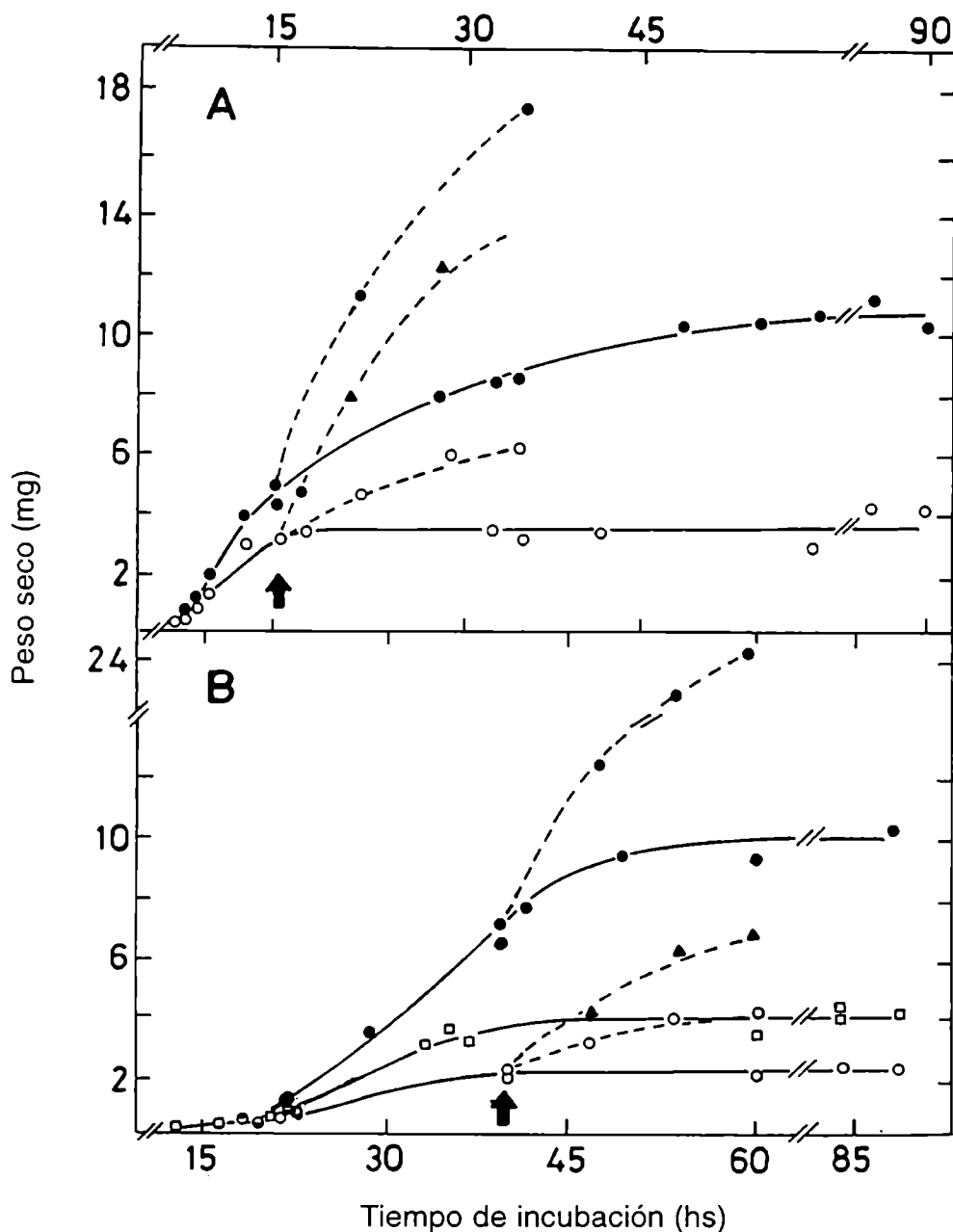


Figura 2- Curvas de crecimiento de Mucor rouxii en DMG.

Panel A- Cultivos de 10⁶ esporas/ml. Condiciones control (—●—) 150 μM dbcAMP (—○—) (Efecto total). En el momento indicado por la flecha se filtraron 4 ml de cultivo y se resuspendieron en el mismo volumen de medio fresco sin agregados (—●---, —▲---) o con 150 μM dbcAMP (---○---).

Panel B- Cultivos de 10⁴ esporas/ml. Condiciones control (—●—), 500 μM dbcAMP (—○—) (Efecto total). 150 μM dbcAMP (—□—) (Efecto parcial). En el momento indicado por la flecha se filtraron 4 ml de cultivo y se resuspendieron en el mismo volumen de medio fresco sin agregados (—●---, —▲---) o con 500 μM dbcAMP (---○---).

El efecto del dbcAMP sobre la morfología celular fue reversible, tal como muestran las Figs. 1D y 1F. El 100% de las células provenientes de cultivos de 10^6 esporas/ml revirtieron a formas con 2 a 5 tubos germinativos por célula madre; mientras que el 20% de las células de 10^4 esp/ml revirtieron emitiendo de 50 a 100 tubos germinativos por célula madre gigante.

EFFECTO DEL dbcAMP SOBRE EL NUMERO DE NUCLEOS, CONTENIDO DE DNA Y PROTEINAS DE LAS CELULAS

Estudiamos el efecto del nucleótido cíclico sobre otros parámetros de crecimiento, ya que la similitud entre las curvas de la Fig.2A durante las primeras 12 hs sugería que el crecimiento no estaba alterado.

La Tabla 2 muestra los resultados observados al contar núcleos teñidos con un colorante fluorescente, de cultivos control y crecidos en presencia de $150 \mu\text{M}$ de dbcAMP. Las figuras A y B insertadas en la Tabla 2 son imágenes representativas de células de 9 hs de cultivo, inoculadas a 10^6 esp/ml, sin o con el agregado de $150 \mu\text{M}$ de dbcAMP.

Los resultados indican que hasta las 9 hs, el número de núcleos de ambos tipos celulares es el mismo. Más allá de estas horas los núcleos de las células esféricas son incontables. La fluorescencia individual de cada núcleo en ambos tipos celulares parece ser la misma, sugiriendo que pudo haber nueva síntesis de DNA y que las partículas individuales observadas no serían consecuencia de la fragmentación de núcleos preexistentes.

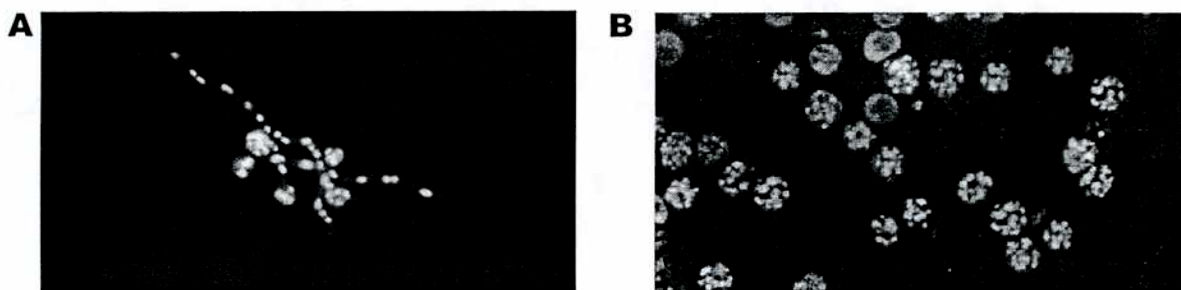
Se determinó el contenido de DNA y proteínas, en puntos seleccionados de las curvas de crecimiento; los resultados se resumen en la Tabla 3. El contenido de DNA de las células luego de 13 hs de cultivo, a 10^6 esp/ml, en ausencia o presencia de $150 \mu\text{M}$ de dbcAMP es similar, corroborando los resultados de la Tabla 2 y sugiriendo que las partículas fluorescentes corresponden a núcleos independientes con contenido normal de DNA.

El contenido de DNA de los cultivos de 10^4 esp/ml de 16 y 40 hs es aproximadamente la mitad del esperado según los datos de peso seco y contenido de proteínas.

Tabla 2- Número de núcleos en cultivo 10^6 esporas/ml \pm 150 μ M dbcAMP.

Tiempo de incubación (hs.)	número de núcleos por célula [x \pm ES (n)]	
	CONTROL	dbcAMP
3	2,1 \pm 0,1(30)	2,0 \pm 0,1 (30)
4	2,8 \pm 0,1(30)	3,2 \pm 0,1 (30)
5	4,1 \pm 0,1(43)	4,6 \pm 0,2 (36)
6	6,8 \pm 0,2(67)	6,5 \pm 0,2 (60)
7	9,5 \pm 0,4(41)	8,2 \pm 0,3 (41)
8	13,2 \pm 0,6(39)	12,7 \pm 0,4 (37)
9	19,9 \pm 0,9(24)	21,0 \pm 0,8 (24)
10	29,4 \pm 1,7(24)	incontable (30)

Muestras de los cultivos correspondientes a los diferentes tiempos de incubación fueron centrifugados, fijados en etanol 70% y teñidos con DAPI, tal como se describen en materiales y métodos.



Tinción de núcleos con DAPI. A) Control 9 hs; **B)** 150 μ M dbcAMP 9 hs **AUMENTO:** 1 cm=28 μ m.

Tabla 3- Contenido de proteínas y DNA en cultivos \pm dbcAMP^a

inóculo (esp/ml)	tiempo incubación (hs)	dbcAMP (μ M)	peso seco (mg)	proteína (μ M)	DNA (μ M)	Número generac. ^b
10^6	13		3,97	431	29,2	66
10^6	13	150	3,23	406	22,0	50
10^6	21		6,08	542	35,0	79
10^6	21	150	3,34	368	30,8	70
10^4	16		0,57	62	5,6	1272
10^4	16	500	0,20	ND ^c	1,0	227
10^4	40		8,68	558	35,3	8022
10^4	40	500	2,05	212	4,2	954

^a 4 ml de cultivo conteniendo 1×10^6 esporas/ml o 1×10^4 esporas /ml se incubaron en medio DMG el tiempo que figura en la Tabla y fueron procesados como figura en Materiales y Métodos.

^b Se calculó el número de generaciones tomando como 1 el contenido de DNA de la espora (0,11 μ g/ 10^6 esporas)

^c Por debajo de la sensibilidad del método

NIVELES DE cAMP INTRA Y EXTRACELULARES EN PRESENCIA DE dbcAMP

Con el objeto de estimar los niveles intra y extracelulares de cAMP en presencia de una concentración 150 μ M de dbcAMP se realizaron determinaciones a dos tiempos, 5 y 7 horas, los cuales corresponden respectivamente a un tiempo previo y posterior a la germinación. Puede observarse en la Tabla 4 que los niveles de cAMP intracelular se encuentran incrementados entre 7 y 9,5 veces, cuando las esporas se cultivan en presencia del análogo, mientras que la concentración extracelular está aumentada entre 80 y 110 veces.

Dado que el dbcAMP interfiere en la determinación de cAMP, se realizaron rigurosos controles durante la purificación del nucleótido cíclico para asegurar que los datos experimentales correspondieran efectivamente a cAMP, los cuales se detallan en Materiales y Métodos.

ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS ALTERACIONES MORFOLOGICAS PROVOCADAS POR EL dbcAMP

Las esporangioesporas de *M. rouxii* crecidas con análogos de cAMP presentan las siguientes características:

- 1) Crecimiento isodiamétrico.
- 2) Pigmentación incrementada. Los cultivos crecidos con dbcAMP tienen un color amarillento mientras que los controles son blancos.
- 3) Pérdida de la adhesividad. Cuando las esporas emiten el tubo germinativo, comienzan a agruparse formando núcleos que compactan el micelio incipiente, sugiriendo interacciones entre proteínas de superficie. Esto no se observa en los cultivos a los cuales se les ha agregado el análogo (ver Fig 1A vs 1C y 1D).
- 4) Fragilidad incrementada. Las células tratadas son muy frágiles y este efecto no puede prevenirse por el agregado de estabilizantes osmóticos. Los estabilizantes utilizados fueron: sorbitol 1M, manitol 1M, NH₄Cl 0,6M y MgSO₄ 0,6M.

Tabla 4- Niveles intracelulares y extracelulares de cAMP

Condiciones de crecimiento	niveles de cAMP ^a	
	intracelular (pmoles/10 ⁶ células)	extracelular (μM)
Control		
5 hs	26 ± 5	0,5 ± 0,2
7 hs	41 ± 4	0,6 ± 0,2
0,15 mM dbcAMP		
5 hs	*180 ± 40	*40 ± 5
7 hs	*390 ± 58	*65 ± 8

^a Los niveles de cAMP se determinaron por RIA como se detalla en Materiales y Métodos.

Los datos corresponden a tres experimentos independientes. Los ensayos se realizaron por duplicado. ANOVA seguido de DUNNETT.

* p < 0,01

5) Es llamativo el hecho de que la concentración de dbcAMP necesaria para alterar la morfología es inversamente proporcional a la densidad del inóculo, a pesar de que la disponibilidad de análogo por parte de las células es superior cuanto menor es el inóculo y de que éste no parece consumirse apreciablemente durante el tiempo de cultivo, a juzgar por el hecho que la morfología se mantiene, aún a prolongados tiempos de incubación, en los cuales no se ha suplementado el medio de cultivo con cantidades adicionales de análogo.

6) Reversibilidad del efecto. Las células vuelven a su morfología normal, emitiendo tubos germinativos cuando se reemplaza el medio de cultivo con nucleótido cíclico por medio de cultivo fresco sin adiciones.

DISCUSION

Puede concluirse de los datos presentados que el efecto principal del dbcAMP sobre la morfología de las esporangioesporas de *M. rouxii* es el mantenimiento del crecimiento isodiamétrico, que ocurre en las etapas tempranas de la germinación (Cano y Ruiz Herrera, 1988) y por ende la inhibición del crecimiento polarizado. Este efecto es reversible.

Este efecto morfológico puede obtenerse, en cultivos de 10^6 esp/ml, sin que prácticamente se observen alteraciones en parámetros de crecimiento tales como número de núcleos, contenido de DNA y proteínas, en las primeras 10-12 hs de incubación.

La inhibición del crecimiento observada a tiempos prolongados de incubación, a esta densidad celular, es probablemente consecuencia del agotamiento del medio de incubación, debido a una aparentemente alta actividad metabólica de las células crecidas en presencia del análogo.

El diámetro de las células provenientes de cultivos inoculados a 10^6 esporas/ml (Fig1C) fue 3,7 veces menor que el diámetro de las células provenientes de cultivos inoculados a 10^4 esporas/ml (Fig 1E), (19 vs 70 μm). Esta variación representa una diferencia de 50 veces en el volumen celular.

El efecto del dbcAMP sobre cultivos de 10^4 esp/ml está acompañado por un retraso en el crecimiento en general, muy probablemente, debido a una restricción impuesta por la morfología de estas células gigantes. A pesar de ello, el alto número de tubos germinativos (50 a 100 tubos/célula en las células tratadas con el análogo vs 1 o 2 tubos/célula en los controles) observado durante la reversión del efecto correlaciona positivamente con el alto contenido de proteínas y material genético almacenado en ellas (Tabla 3).

El volumen al que llegan estas células es una consecuencia del mayor número de divisiones celulares que deben sufrir hasta llegar a la fase estacionaria, manteniendo su crecimiento isodiamétrico (obsérvese en la Tabla 3 el número de generaciones, estimado en base al contenido de DNA, para un cultivo de 10^6 esporas/ml versus un cultivo de 10^4 esporas/ml).

El bajo porcentaje de reversión observado en los cultivos de 10^4 esp/ml puede deberse a la baja viabilidad de las células gigantes durante el proceso de filtración. Estas células son muy frágiles, ya que se rompen por la presión ejercida por el cubreobjeto en las muestras preparadas para observación microscópica sin fijación previa.

La alta concentración de cAMP intra y extracelular observada sugiere que el dbcAMP puede estar actuando sobre la PDE bloqueándola e impidiendo la degradación del cAMP. Otra posibilidad que no puede excluirse, y que no ha sido estudiada, es que el dbcAMP esté actuando sobre la adenilato ciclasa, aumentando la síntesis del cAMP. Dadas las altas concentraciones extracelulares de cAMP observadas, no parece que el análogo estuviera actuando sobre el eflujo del nucleótido cíclico.

Existen evidencias en la literatura relacionando pigmentación por carotenogénesis y cAMP en *Mucor mucedo* y *Mucor hiemalis* (Jones y Bu'Lock, 1977). También se ha sugerido entrecruzamiento entre la vía de transducción de señales por cAMP y la carotenogénesis en hongos (Dandekar y Modi, 1980; Govind y Modi, 1981; Hohl *et al.*, 1992)

Se ha reportado la importancia del cAMP como modulador de la adhesividad celular en células de mamíferos (Mazurov *et al.*, 1988; Tursken *et al.*, 1990; Sung *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 1993; Glass *et al.*, 1993; Stockl *et al.*, 1995)

Se han descrito, en eucariotas superiores, procesos de diferenciación asociados a cAMP que dependen de la densidad celular (Rodgers *et al.*, 1989; Egan *et al.*, 1991).

El impedimento del crecimiento polarizado caracterizado aquí, es un rasgo general que se ha observado no sólo en *M. rouxii* sino en otras especies de Mucorales, tanto dimórficas como monomórficas, por el agregado de dbcAMP durante la germinación (Jones *et al.*, 1977; Orłowski, 1979, 1980; Wertman *et al.*, 1981) o en la transición levadura-micelio (Larsen y Sypherd, 1974; Paveto *et al.*, 1975) en especies dimórficas.

En eucariotas superiores se han reportado también alteraciones de la polaridad en células en cultivo por el agregado de dbcAMP, en una amplia variedad de tipos celulares tales como células CHO (Hsie y Puck, 1971), células epiteliales del iris (Ortiz *et al.*, 1973), células gliales (Steinbach y Schubert, 1975), células de Sertoli (Spruill *et al.*, 1981) y células mesangiales (Glass *et al.*, 1993).

EFFECTO DE COMPUESTOS QUE AFECTAN LA VIA DE TRANSDUCCION DE SEÑALES POR cAMP SOBRE MORFOLOGIA

EFFECTO DE ANALOGOS SITIO ESPECIFICOS SOBRE MORFOLOGIA

La subunidad regulatoria dimérica R de la PKA, contiene dos sitios de unión para cAMP por cadena. Estos sitios de unión intracatenarios pueden diferenciarse como sitio 1 y sitio 2 de acuerdo a su especificidad para diferentes análogos de cAMP (Scott, 1991; Døskeland *et al.*, 1993; Francis y Corbin, 1994). Se ha descrito sinergismo, *in vivo*, entre los análogos sitio específicos ensayados en varios sistemas celulares (Beebe *et al.*, 1984, 1989).

El dbcAMP fue diseñado con el objeto de disponer de un análogo lipofílico del cAMP que penetrara fácilmente en las células, pero no posee una estructura capaz de conferirle especificidad de sitio en su unión a R.

Con el objeto de investigar su efecto sobre la morfología se agregaron diferentes análogos al medio de cultivo conteniendo esporas de *M. rouxii*. Los análogos seleccionados fueron: N⁶-benzoil-cAMP y N⁶-monobutiril-cAMP, específicos para el sitio 2 y 8-bencilamino-cAMP, 8-azido-cAMP, y 8-bromo-cAMP, específicos para el sitio 1.

Como control se agregaron dbcAMP así como sus dos putativos productos de hidrólisis: O²'monobutiril-cAMP y butirato.

Los resultados están resumidos en la Tabla 5. Los análogos específicos de sitio 2 promueven el crecimiento isodiamétrico de las esporas a una concentración de 0,6 y 1,5 mM respectivamente; mientras que los análogos específicos de sitio 1 no producen efecto a ninguna de las concentraciones estudiadas. El dbcAMP agregado a una concentración 0,15 mM inhibe el crecimiento polarizado, mientras que sus derivados, ensayados a la máxima concentración que podrían alcanzar si su hidrólisis fuera completa (0,15 mM) no presentan ningún efecto.

Con el objeto de observar si era posible obtener sinergismo *in vivo*, se realizaron ensayos combinando análogos específicos de sitio 2 y de sitio 1.

El diseño experimental fue tal que se seleccionaron concentraciones de análogos de sitio 2 que producían efectos parciales en la morfología combinados con diferentes concentraciones de análogos de sitio 1.

Un ejemplo fue 0,3 mM de N⁶ benzoil-cAMP (que producía efecto parcial, agregado solo) en combinación con 0,5 a 3 mM de 8-bencilamino cAMP.

Con ninguna de las variantes experimentales ensayadas se obtuvo sinergismo.

Según Beebe *et al.*, (1984) la potencia de los análogos *in vivo* puede ser explicada considerando

- la permeabilidad de los compuestos
- la estabilidad a la degradación por la fosfodiesterasa de cAMP
- la potencia como activadores de la PKA

En la Tabla 6 pueden observarse los datos obtenidos por varios investigadores sobre la permeabilidad de los análogos y la estabilidad a la degradación por la fosfodiesterasa de cAMP.

La permeabilidad de los compuestos a la membrana plasmática, medida por su coeficiente de partición en fase acuosa/orgánica (Beebe *et al.*, 1984); o estimado por su tiempo de retención en HPLC fase reversa (Braunmann *et al.*, 1985) es del mismo orden, excepto para el 8-bencilamino-cAMP el cual es extremadamente lipofílico.

Tabla 5- Efecto de análogos de cAMP sobre morfología^a

Compuesto	Concentración (mM)	Morfología ^b
N ⁶ -ben-cAMP	0,15	M
	0,3	P
	0,6	T
	1,0	T
N ⁶ -but-cAMP	0,5	P
	1,0	P
	1,5	T
8-N ₃ -cAMP	1,0	M
8-Br-cAMP	1,0	M
8-ben-cAMP	1,0	M
	3,0	M
dbcAMP	0,15	T
O ² -but-cAMP	0,15	M
butirato	0,15	M
	0,3	M

^a Las esporas se inocularon a 1×10^6 /ml en medio DMG y se cultivaron durante 16 hs con la adición de los compuestos que se indican en la Tabla.

^b En la figura 1 A,B,C pueden observarse imágenes representativas de las morfologías mencionadas : M= micelio ; P=efecto parcial ; T=efecto total.

Tabla 6 - Parámetros de los análogos de cAMP

Compuesto	Lipofilicidad	PDE IC ₅₀ (μM)
N ⁶ -ben-cAMP	3,0 ^a	30
N ⁶ -but-cAMP	1,3 ^a ; 1,4 ^b	50
8-N ₃ -cAMP	sin datos	10
8-Br-cAMP	1,6 ^a ; 1,4 ^b	10
8-ben-cAMP	10,9 ^a	80
dbcAMP	2,2 ^b	1000

^a Coeficiente de partición obtenido de Beebe *et al* (1984)

^b Coeficiente de partición obtenido de Braunmann y Jastorff (1985)

^c Los datos de IC₅₀ se obtuvieron como se detalla en Materiales y Métodos

La estabilidad a la degradación por la PDE de cAMP de los análogos, estimada como la capacidad de los mismos de competir por la hidrólisis del [^3H] cAMP, fue reportada por Tomes y Moreno en 1990 ; en este trabajo se completaron los datos con las determinaciones para el dbcAMP y el 8-bencilamino-cAMP, según el protocolo experimental que se detalla en Materiales y Métodos.

Los análogos presentan valores de IC_{50} que se encuentran entre 10 y 80 μM salvo el dbcAMP que tiene un IC_{50} de 1 mM.

Activación de la PKA por análogos de cAMP sitio específicos

Se realizaron curvas de activación de la PKA con concentraciones crecientes de análogos de cAMP entre 0,1 y 100 μM , utilizando preparaciones parcialmente purificadas de enzima, según se detalla en Materiales y Métodos. Los ensayos se realizaron con dos concentraciones de enzima 0,2 y 2 nM.

Las curvas de activación están graficadas en la Fig. 3. La Fig.3A ilustra las curvas de activación para 0,2 nM de enzima y puede observarse que las $A_{0,5}$ para los diferentes compuestos se encuentran comprendidas entre 0,2 y 0,6 μM .

La activación de la PKA, para una concentración 2 nM de enzima se muestra en la Fig. 3B, en este caso las $A_{0,5}$ se encuentran aproximadamente entre 1 y 100 μM .

Por último se realizaron ensayos de activación en células permeabilizadas. En este sistema se mantienen la localización y la estructura de los componentes celulares, permitiendo realizar las determinaciones enzimáticas en condiciones que se asemejan a las situaciones *in vivo*. Los resultados pueden observarse en la Fig. 3C. Las $A_{0,5}$ para los análogos están distribuidas entre 0,8 y 100 μM aproximadamente.

Las curvas de activación para el dbcAMP no fueron dibujadas porque no es un análogo sitio específico; los datos de activación obtenidos con este compuesto fueron una $A_{0,5}$ de 30 nM para 0,2 nM de enzima, mientras que para las demás condiciones experimentales fue superior a 100 μM .

EFFECTO DE INHIBIDORES DE PDE SOBRE MORFOLOGIA

Si la emisión del tubo germinativo en *M. rouxii* estuviera regulada por la actividad de la PKA, la adición de inhibidores de PDE al medio de cultivo debería incrementar los niveles endógenos de cAMP y promover un efecto en la morfología similar al provocado por el agregado de análogos de cAMP.

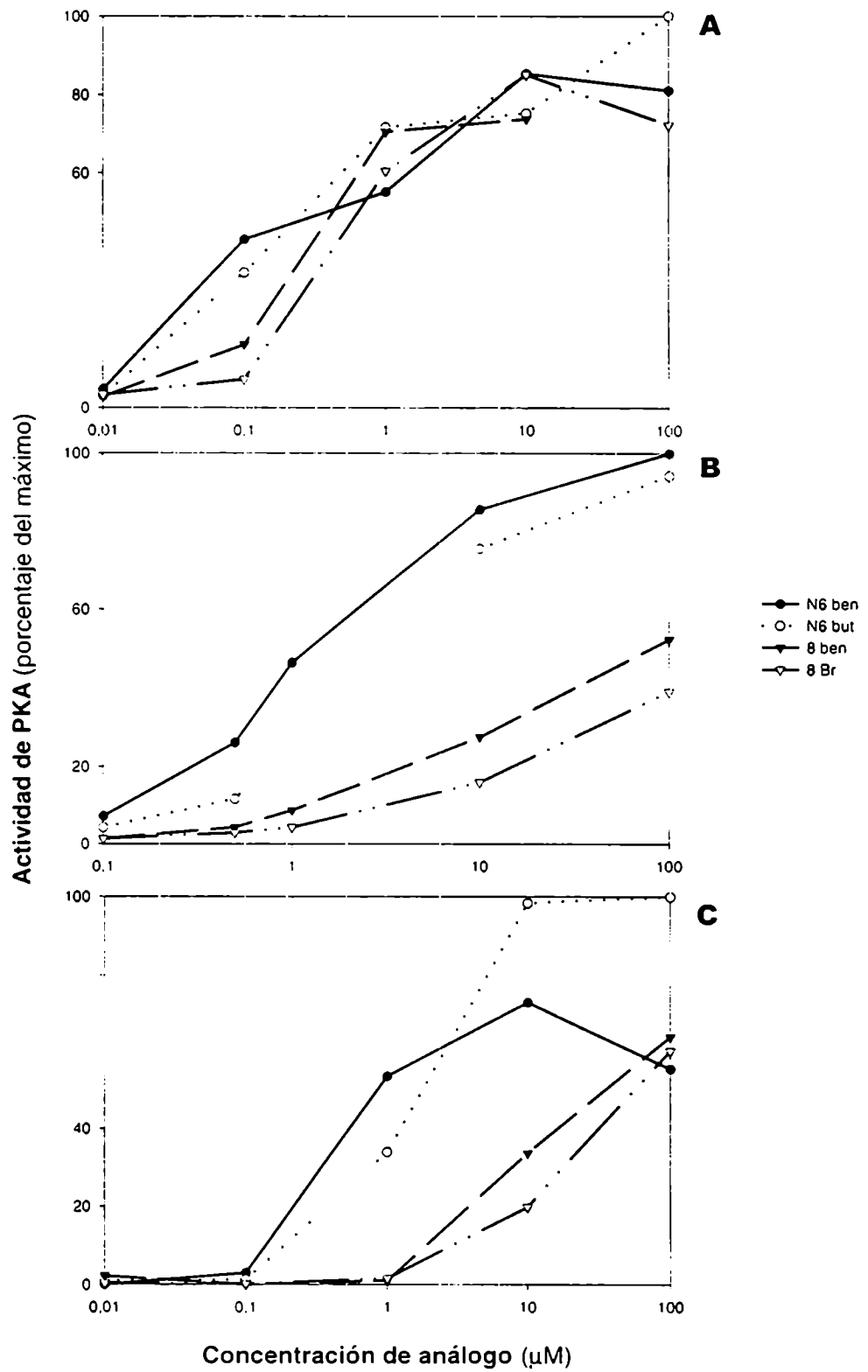


Figura 3- Curvas de activación de quinasa de proteínas A por análogos de cAMP A) 0,2 nM de holoenzima; B) 2 nM de holoenzima; C) células permeabilizadas.

La Tabla 7 muestra el efecto observado al agregar concentraciones variables de seis inhibidores de PDE al medio de cultivo. Los compuestos fueron seleccionados de una lista de drogas cuyos efectos *in vitro* sobre la PDE de alta afinidad de *M. rouxii* habían sido estudiados por Tomes y Moreno (1990). Papaverina, CI 930, dipiridamole y SQ 65,442 no ejercen efectos secundarios sobre la actividad de PKA *in vitro* (Tomes *et al.*, 1993); IBMX y teofilina fueron ensayados porque son los compuestos más ampliamente usados en la literatura, como inhibidores de PDE. Como puede observarse en la Tabla 7 SQ 65,442 produce un efecto dosis dependiente sobre la morfología, obteniéndose un efecto total (Fig 4C) con 0,1 mM, similar al producido por los análogos N⁶-cAMP y el dbcAMP (Fig 4B ; la Fig 4A corresponde a las células control), pero a diferencia de lo que sucede con los análogos, el SQ 65,442 afecta el crecimiento.

Para asegurar que la morfología observada no fuera el resultado de un retraso en el crecimiento se realizaron cultivos con el inhibidor hasta que los volúmenes alcanzados por las células, en presencia del inhibidor, fueran muy superiores a los volúmenes de las células control en el momento de la germinación, observándose en todos los casos un crecimiento isodiamétrico.

EFFECTO DEL TIEMPO DE AGREGADO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA MORFOLOGIA

Los efectos descritos hasta este momento fueron observados cuando se adicionaban los compuestos en el medio de cultivo al iniciarse la incubación.

Se diseñó el siguiente experimento para investigar el efecto producido por los análogos agregados a diferentes tiempos luego del inicio de la germinación: se agregaron 0,6 mM de N⁶-benzoil-cAMP o 0,15 mM de dbcAMP al medio de cultivo a 0, 1, 3, 5, 7, horas de crecimiento. La observación se realizó a las 16 hs. de cultivo y las morfologías observadas fueron idénticas a las correspondientes al agregado del análogo a tiempo cero (Fig 5A y B).

Cuando el compuesto se agregó a las 7 hs. de cultivo, una vez que se había producido la germinación, la morfología se vio severamente alterada; como puede observarse en la Fig. 5C el crecimiento continuó en forma no polarizada, redondeando las puntas de las hifas.

Tabla 7 - Efecto de inhibidores de PDE sobre morfología

Compuesto	Concentración (mM)	Morfología
Papaverina	0,1	M
IBMX	1,0	M
Teofilina	1,0	M
CI 930	1,0	M
dipiridamol	1,0	M
SQ 65,442	0,01	M
	0,05	P
	0,1	T

Los compuestos se agregaron al medio de cultivo DMG al comienzo de la incubación. Las esporas se inocularon a 1×10^6 /ml . La duración del cultivo fue de 16 hs.

En la figura 5 A,B,C pueden observarse imágenes representativas de las morfologías mencionadas.

En la Figura 1B pueden observarse efectos parciales obtenidos con 150 μ M dbcAMP. Los efectos parciales con 50 μ M de SQ 65,442 no están ilustrados.

Se realizaron controles para estimar el efecto producido por los solventes en los que se disolvieron algunas drogas.

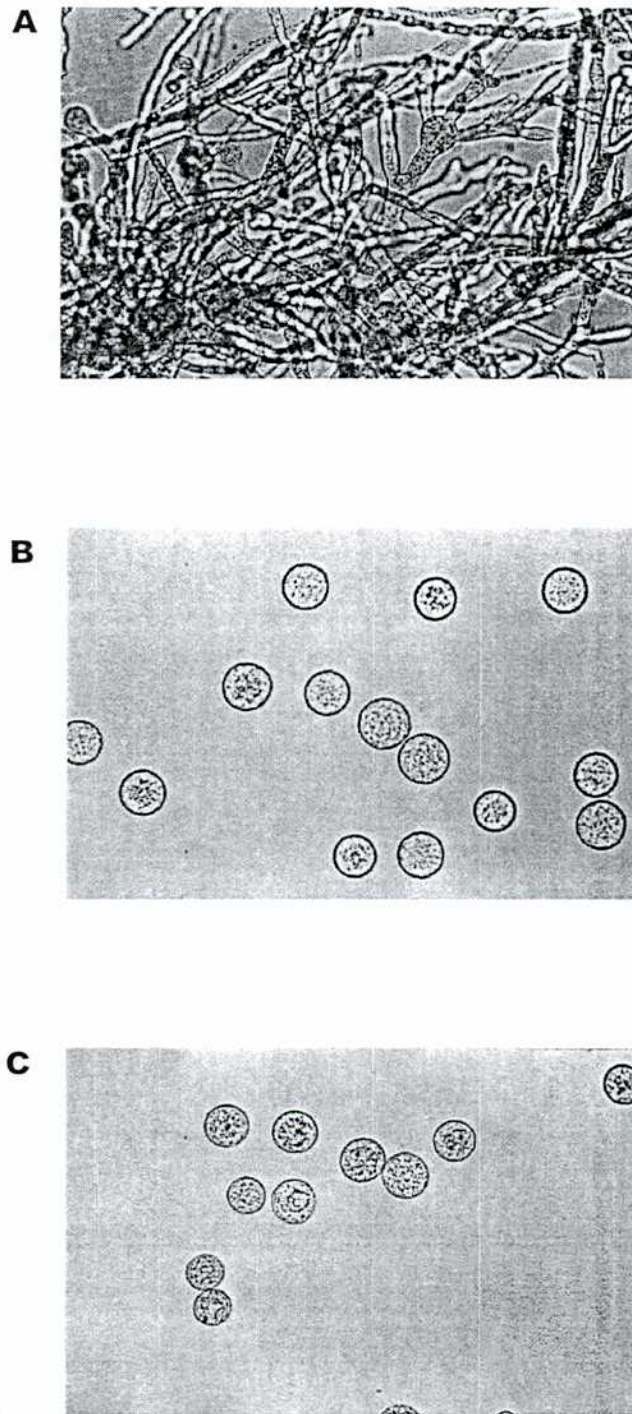


Figura 4- Efecto de inhibidores de PDE sobre morfología. Medio DMG, 10^6 esporas/ml, 16 hs de cultivo. **A-** Control sin agregados. **B-** $150 \mu\text{M}$ dbcAMP. **C-** $100 \mu\text{M}$ SQ 65,442.
Aumento: 1 cm=28 μm .

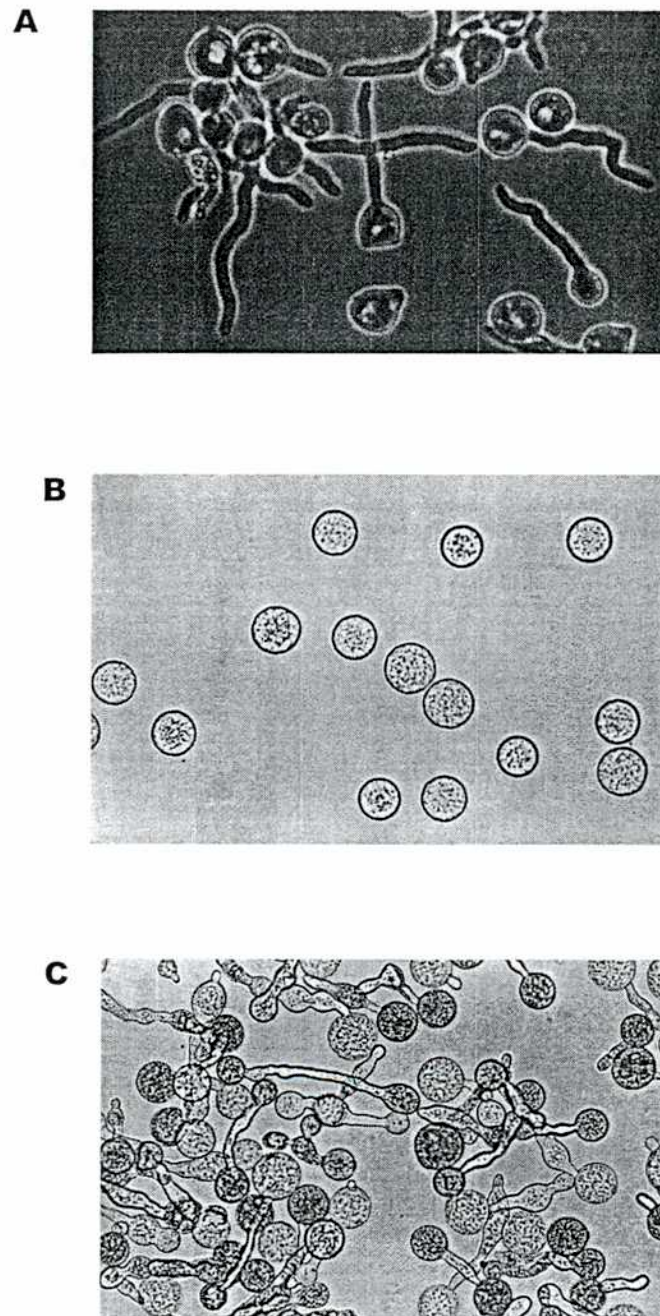


Figura 5- Agregado de análogos de cAMP a distintos tiempos durante la germinación. Medio DMG, 10^6 esporas/ml. **A-** Control sin agregados, 7 hs de cultivo. **B-** Análogo agregado antes de la emisión del tubo germinativo, 16 hs de cultivo. **C-** Análogo agregado luego de 7 hs de cultivo (luego de la emisión del tubo germinativo) y cultivado hasta 16 hs. **Aumento:** A 1 cm= 14 μ m, B y C 1 cm=28 μ m.

Los experimentos realizados agregando el inhibidor de PDE en diferentes tiempos durante la germinación, arrojaron resultados similares a los obtenidos con los análogos. La adición del compuesto luego de la emisión de la hifa conduce a un crecimiento isodiamétrico y tal como sucede con los análogos la remoción del compuesto del medio de incubación revierte a un crecimiento polarizado (datos no mostrados).

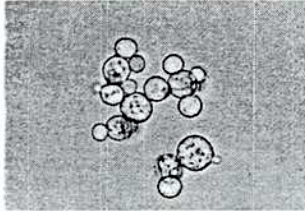
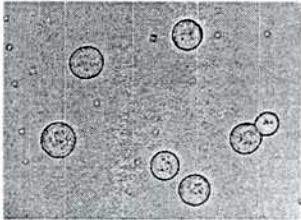
EFFECTO DE ANALOGOS DE cAMP Y DEL SQ 65,442 SOBRE LA MORFOLOGIA, BAJO DIFERENTES CONDICIONES NUTRICIONALES Y AMBIENTALES

La inhibición del crecimiento polarizado producido por los análogos de cAMP y el SQ 65,442, que hemos descrito hasta este momento, fue caracterizada durante la germinación aeróbica, en medio definido conteniendo glucosa como fuente de carbono (DMG).

Con el objeto de observar si la inhibición de la polarización era un efecto general producido por los análogos de cAMP y el SQ 65,442, realizamos incubaciones variando la complejidad del medio de cultivo y las condiciones ambientales.

Los medios utilizados para crecimiento aeróbico fueron medio definido con glucosa (DMG), el mismo medio con maltosa como fuente de carbono (DMM), medio definido con glucosa, enriquecido con casaminoácidos (DMCG) y el clásico medio rico (YPG). Consideramos que el medio que contiene maltosa como fuente de carbono se asemeja a un medio con muy bajo contenido de glucosa ya que la metabolización de la maltosa no es directa en *M. rouxii*, sino que necesita ser desdoblada a glucosa por la α -glucosidasa, la cual se encuentra en la pared celular y es inducible por maltosa (Reyes y Ruiz Herrera, 1972). Este hecho conduce a que haya niveles muy reducidos de glucosa accesibles para el microorganismo durante la germinación; luego de la emisión del tubo germinativo es probable que los niveles de la α -glucosidasa se eleven, aumentando la disponibilidad de glucosa y permitiendo el crecimiento exponencial característico de las primeras etapas del crecimiento vegetativo. Los efectos a ser descritos en las Tablas 8 y 9, en un medio con maltosa son reproducidos cuando se utiliza medio definido suplementado con 1 mg/l de glucosa como fuente de carbono (en vez de 20 g/l), aunque en esta situación el crecimiento se detiene poco después de la emisión del tubo germinativo por el agotamiento de la glucosa.

Tabla 8- Efecto morfológico bajo diferentes condiciones ambientales y nutricionales

Medio de cultivo	Compuesto	Morfología
Aire ^a		
DMM	0,15 mM dbcAMP	T
DMG	0,15 mM dbcAMP	T
DMCG	3 mM dbcAMP	T
YPG	10 mM dbcAMP	P
	0,1 mM SQ 65,442	T
Atmósfera CO ₂ ^b		
YPG	10 mM dbcAMP	Y
	0,1 mM SQ 65,442	T
		
		
control ^c		+ 0,1 mM SQ 65,442 ^c

^aCultivos aeróbicos : los compuestos se agregaron a los diferentes medios de cultivo al comienzo de la incubación y se observaron a las 16 hs de cultivo.

^bCultivos anaeróbicos : los compuestos se agregaron al medio YPG a las 14 hs de incubación y se observaron a las 30 hs de cultivo.

^cInserto : imágenes representativas de células levaduriformes (Y) y de células esféricas obtenidas con 0,1 mM de SQ 65,442 ; ambos cultivos fueron realizados en medio YPG y anaerobiosis.

El crecimiento anaeróbico bajo atmósfera de CO₂ se desarrolló en YPG, ya que el crecimiento levaduriforme no ocurre en medio definido (Bartnicki-García *et al.*, 1962) y comprobamos que las esporas crecidas anaeróbicamente en DMCG prácticamente no geman, no resultando ser éste un buen modelo para observar el crecimiento isodiamétrico

Los resultados están resumidos en la Tabla 8 y muestran que bajo todas las condiciones ambientales o nutricionales ensayadas, el crecimiento polarizado es reemplazado por crecimiento isodiamétrico ya sea con dbcAMP o con SQ 65,442. Bajo las condiciones de crecimiento aeróbico puede observarse que cuanto más rico es el medio de cultivo mayor es la concentración de dbcAMP necesaria para obtener el efecto sobre la morfología. En YPG sólo se observan efectos parciales a las más altas concentraciones ensayadas (10 mM). El SQ 65,442 inhibe la emergencia del tubo germinativo en medio rico a la misma concentración que en medio definido.

Bajo condiciones de crecimiento anaeróbico en medio rico el SQ 65,442 impide la gemación (ver Tabla 8 figura insertada); el dbcAMP ensayado hasta una concentración de 10 mM no produce efectos.

DISCUSION

Los resultados experimentales indican que el crecimiento isodiamétrico puede obtenerse con análogos de cAMP específicos para sitio 2 de la subunidad regulatoria y por el inhibidor de la PDE SQ 65,442.

Analizando los criterios postulados por Beebe para explicar la potencia de los análogos *in vivo* puede concluirse que el comportamiento observado podría explicarse teniendo en cuenta las diferencias existentes entre los análogos como activadores de la PKA, ya que como puede observarse en la Tabla 6 no existen diferencias importantes en los otros parámetros considerados.

La permeabilidad a la membrana plasmática es similar para todos los compuestos ensayados salvo el 8-bencilamino-cAMP, que es extremadamente lipofílico y podría quedar retenido en la membrana.

El ensayo de competencia de la hidrólisis del [³H]cAMP por los análogos permite estimar la estabilidad de los mismos frente a la degradación por la PDE y las IC₅₀ pueden ser una medida de la resistencia a la hidrólisis, siempre y cuando el mecanismo

de inhibición sea competitivo. Por experiencias previas de nuestro laboratorio sabíamos que la inhibición era competitiva (S. Moreno, comunicación personal).

La afinidad de estos compuestos hacia la PDE de *Mucor*, determinada por el IC_{50} para la hidrólisis de cAMP se encuentra en el mismo rango para todos los compuestos ensayados.

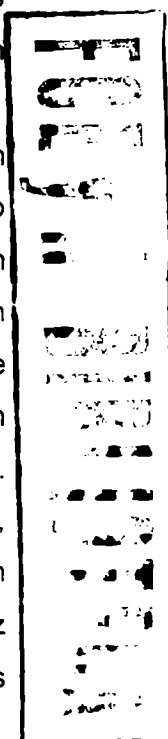
Los resultados observados *in vivo* con los análogos sitio específicos correlacionan con su potencia como activadores de la PKA en los sistemas *in vitro* y en células permeabilizadas.

Es interesante señalar que las diferencias exhibidas por los distintos análogos en la activación de la PKA son más evidentes cuanto más concentrada está la enzima, lo cual se refleja en las $A_{0,5}$. A baja concentración de enzima las mismas se encuentran entre 0,2 y 0,6 μM , a altas concentraciones y en células permeabilizadas las $A_{0,5}$ están entre 1 y 100 μM . Cuanto más concentrada está la enzima mayor es la concentración de análogos necesaria para activarla; obsérvese que en la Fig 3B las curvas de activación se separan en haces reflejando la mayor potencia de los análogos específicos de sitio 2. En tejidos de mamíferos, se ha reportado que la PKA, a concentraciones fisiológicas, necesita altos niveles de cAMP para ser activada (Beavo *et al.*, 1974). Los ensayos en células permeabilizadas corroboran esta observación para la PKA de *M. rouxii*; a la vez que introducen el resultado original de un comportamiento diferencial de los análogos sitio específico a medida que aumenta la concentración de enzima.

Las diferencias que presentan los análogos para activar la PKA, cuando las concentraciones enzimáticas son altas, también podrían explicar la imposibilidad de obtener sinergismo *in vivo*, dado que probablemente serían necesarias concentraciones superiores a 1 mM para que los análogos específicos de sitio 1 combinados con los de sitio 2 activaran sinérgicamente a la enzima.

Analizando los mismos parámetros para el dbcAMP, el cual no presenta especificidad de sitio para su acción, puede destacarse que su capacidad para producir el efecto morfológico parece estar basada en su alta resistencia a la hidrólisis por la PDE de *M. rouxii*, dado que su lipofilia es comparable a la del N^6 -benzoil-cAMP pero su $A_{0,5}$ para activar la PKA es dos órdenes mayor.

Estas observaciones se ven reforzadas por el hecho que en presencia de dbcAMP las células tienen niveles de cAMP 10 veces superiores a los controles.



Los resultados obtenidos con el SQ 65,442 están en concordancia con el hecho de que este compuesto es el mejor inhibidor, *in vitro*, de PDE de *M. rouxii*. El IC₅₀ para la hidrólisis de 1 μ M de cAMP es 0,01 mM, al menos un orden menor que los IC₅₀ para el resto de los compuestos ensayados (Tomes y Moreno, 1990), y tiene la ventaja adicional de ser un compuesto lipofílico. No es sorprendente el hecho de que *M. rouxii* sea insensible a IBMX y teofilina ya que se ha reportado que las PDE de otros eucariontes inferiores, como *S. cerevisiae*, también son insensibles a los inhibidores clásicos (Van Lookeren *et al.*, 1990).

La observación de que se obtiene el mismo efecto agregando los compuestos a tiempo cero que inmediatamente antes de la emisión del tubo germinativo sugiere que el rol del cAMP es importante en este estadio final de la germinación. Estos resultados son compatibles con los observados por Rossi y Moreno (1994) quienes sugieren la participación de la PKA en los primeros minutos de iniciada la germinación de las esporangioesporas y en el estadio final.

El hecho que tanto el análogo de cAMP como el inhibidor de PDE agregados después de la germinación alteren la morfología sugiere que el crecimiento polarizado es el resultado de un proceso regulatorio que debe ser mantenido siempre y que la PKA participa en esta regulación. Una observación adicional que avala esta sugerencia es la inmediata reversión de crecimiento isodiamétrico a polarizado, cuando se remueven los compuestos del medio de incubación.

Analizando el efecto desde el punto de vista de las condiciones nutricionales y ambientales puede observarse que la inhibición del crecimiento polarizado puede obtenerse en cualquier situación estudiada ya sea con análogos de cAMP y/o inhibidores de la PDE, lo que sugiere que es un efecto general mediado por la PKA.

ACTIVIDAD DE PKA Y DIFERENCIACION

CONSIDERACIONES EXPERIMENTALES DE MEDICION DE C Y R

Para medir en forma adecuada la actividad específica de la subunidad catalítica de la PKA en extractos de células, se hicieron experimentos previos para determinar las condiciones de ensayo que aseguraran la medición de la actividad en condiciones lineales.

Para extractos totales, sin purificación, se determinó que no había proporcionalidad entre la alícuota de homogenato ensayada y la actividad quinasa por encima de 4 µg de proteína total. Se eligió entonces una cantidad de proteína total que varió entre 2 y 4 µg. Dado que en esa cantidad de proteína la cantidad de enzima es sumamente baja se trabajó con una alta actividad específica de [γ - 32 P]ATP (aproximadamente 1000 cpm/pmol).

La actividad enzimática fue medida siempre en ausencia y presencia de cAMP 10 µM. Sin embargo creemos que esta relación, es decir la actividad en ausencia de cAMP dividida por la actividad en presencia de cAMP, no refleja el grado de activación endógena de esta enzima, afirmación que concuerda con las observaciones de Døskeland (Ekanger *et al.*, 1989). Esto se debe a que si la dilución hecha a la muestra para hacer el ensayo en condiciones de linealidad es demasiado alta, tal que la concentración final de la enzima esté en el orden de su K_d se puede desplazar el equilibrio entre la forma holoenzima y sus subunidades hacia la disociación. Es decir que a concentraciones bajas de holoenzima las subunidades de PKA se disocian en ausencia de cAMP (Døskeland *et al.*, 1993). De los datos de la capacidad ligante de cAMP de la subunidad R publicados por Rossi y Moreno (1994), se puede estimar una concentración de holoenzima del orden de subnanomolar cuando se trabaja con extractos crudos de las muestras obtenidas a los distintos tiempos de germinación, diluidos a 0,05 mg/ml. Si bien no conocemos la K_d para la interacción R-C en *M. rouxii*, una concentración subnanomolar como la encontrada, es del orden de la K_d para eucariontes superiores (0,1 nM), (Døskeland *et al.*, 1993) y muy inferior a la IC_{50} publicada para la inhibición de C de *S. cerevisiae* por su R homóloga que es de 40 nM (Kuret *et al.*, 1988). De hecho, extractos crudos de *S. cerevisiae* a una concentración de 0,1 mg/ml, con una concentración de holoenzima de 0,2 nM presentan actividad de PKA completamente independiente de cAMP (Zarembeg V., comunicación personal). Diversas evidencias (Zarembeg V., comunicación personal) sugieren que la afinidad entre R y C de *M. rouxii* es superior a la de otros eucariontes inferiores.

Para eliminar las posibles interferencias aportadas por el cAMP endógeno y los análogos de cAMP, los homogenatos totales se incubaron con carbón, previamente a ser ensayados, como se detalla en Materiales y Métodos.

En los casos en que se midió actividad de PKA en extractos parcialmente purificados por DEAE-Sepharosa se determinó la actividad en todas las fracciones que

eluyeron de la columna para ubicar aquella en que eluía C (eluye con el lavado de la columna), para asegurar que los resultados contemplaran tanto la actividad aportada por la holoenzima como la correspondiente a la subunidad C libre.

La actividad de PKA se midió en extractos frescos no congelados porque la subunidad C no resiste el congelamiento.

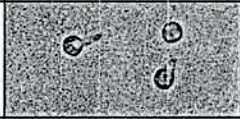
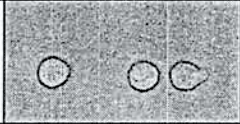
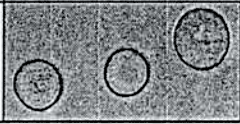
Dado que la actividad específica de la subunidad regulatoria de la PKA fue medida por la capacidad de unión a [³H]cAMP fue esencial que hubiera intercambio total entre el cAMP endógeno y el [³H]cAMP agregado (Døskeland *et al.*, 1993). Estas condiciones se alcanzaron incubando 30 min a 30° C.

NIVELES DE PKA BAJO DIFERENTES CONDICIONES NUTRICIONALES

Cuando analizamos el efecto de los análogos sobre la morfología de las esporas cultivadas en diferentes medios observamos, como se muestra en la Tabla 9, que en los cultivos control, cuanto más pobre era el medio de cultivo más temprano era el tiempo de la germinación y menor era el diámetro de las células en el momento de la emisión del tubo germinativo. El cociente entre los volúmenes de las células en este momento, (calculados a partir de sus diámetros), fue equivalente a los cocientes entre los pesos secos o el contenido de proteínas indicando que el volumen celular podría ser tomado como una medida del crecimiento celular. Las células que crecen en DMM germinan a las 3,5 horas de cultivo con un volumen que es 0,66 veces el correspondiente al de las células que crecen en DMG, las cuales germinan a las 5,5 horas, mientras que aquellas que crecen en YPG son 5,7 veces mayores que las de DMG, y germinan a las 7 horas de crecimiento.

Por un trabajo previo de nuestro laboratorio (Rossi y Moreno, 1994), sabemos que los niveles de PKA de las esporangioesporas crecidas en YPG disminuye inmediatamente después del inicio de la germinación, luego de un incremento transiente en los niveles de cAMP. Luego de este estadio, la actividad específica y la concentración de PKA disminuyen en la medida en que aumentan la proteína total y el volumen; en horas cercanas a la emisión del tubo germinativo la actividad específica de la PKA se eleva significativamente.

Tabla 9- Medio de cultivo y parámetros celulares al momento de la emisión del tubo germinativo^A

medio de cultivo	tiempo de emisión (hs)	diámetro ^B (mm ³)	células al tiempo de emisión	volumen ^C (mm ³)	peso seco (mg/ 4x10 ⁷ cel.)	proteína (mg/ 4x10 ⁷ cells)
DMM	3.5	6.85 ± 0.07		168 ± 5	4.4 ± 0.1	N.D. ^d
DMG	5.5	7.85 ± 0.07		253 ± 7	6.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1
YPG	7	14.03 ± 0.06		1446 ± 17	38.4 ± 0.1	10.8 ± 0.1

^ALas esporas fueron inoculadas a 1X10⁶/ml en los diferentes medios de cultivo. Se consideró tiempo de emisión cuando el 50% de las células habían emitido el tubo germinativo.

^B Los diámetros se midieron en 100 células por cultivo.

^C Los volúmenes se calcularon a partir de las mediciones de los diámetros celulares.

^d ND no determinado.

Se midieron los niveles de PKA durante la germinación en diferentes condiciones nutricionales. Los resultados están ilustrados en la Fig.6; en el gráfico A pueden observarse los niveles de PKA en medio definido DMM, los cuales tienen su valor máximo en las esporas no germinadas, disminuyendo significativamente en la primera media hora, y manteniéndose luego aproximadamente en el mismo rango debido a los pequeños incrementos sufridos en las proteínas totales, dados por las restrictivas condiciones de cultivo. Entre las 3 y las 4 hs hay síntesis activa ya que la actividad se mantiene constante a pesar que el peso seco se duplica.

La Fig 6B muestra los niveles de PKA en medio definido DMG, los cuales pasan por un mínimo a las 1,5 horas, aumentando lentamente hasta una significativa elevación en tiempos previos a la germinación.

En la Fig 6C están graficados los niveles de PKA en medio YPG determinados por Rossi y Moreno (1994), reproducidos aquí para establecer comparaciones con las otras condiciones de cultivo.

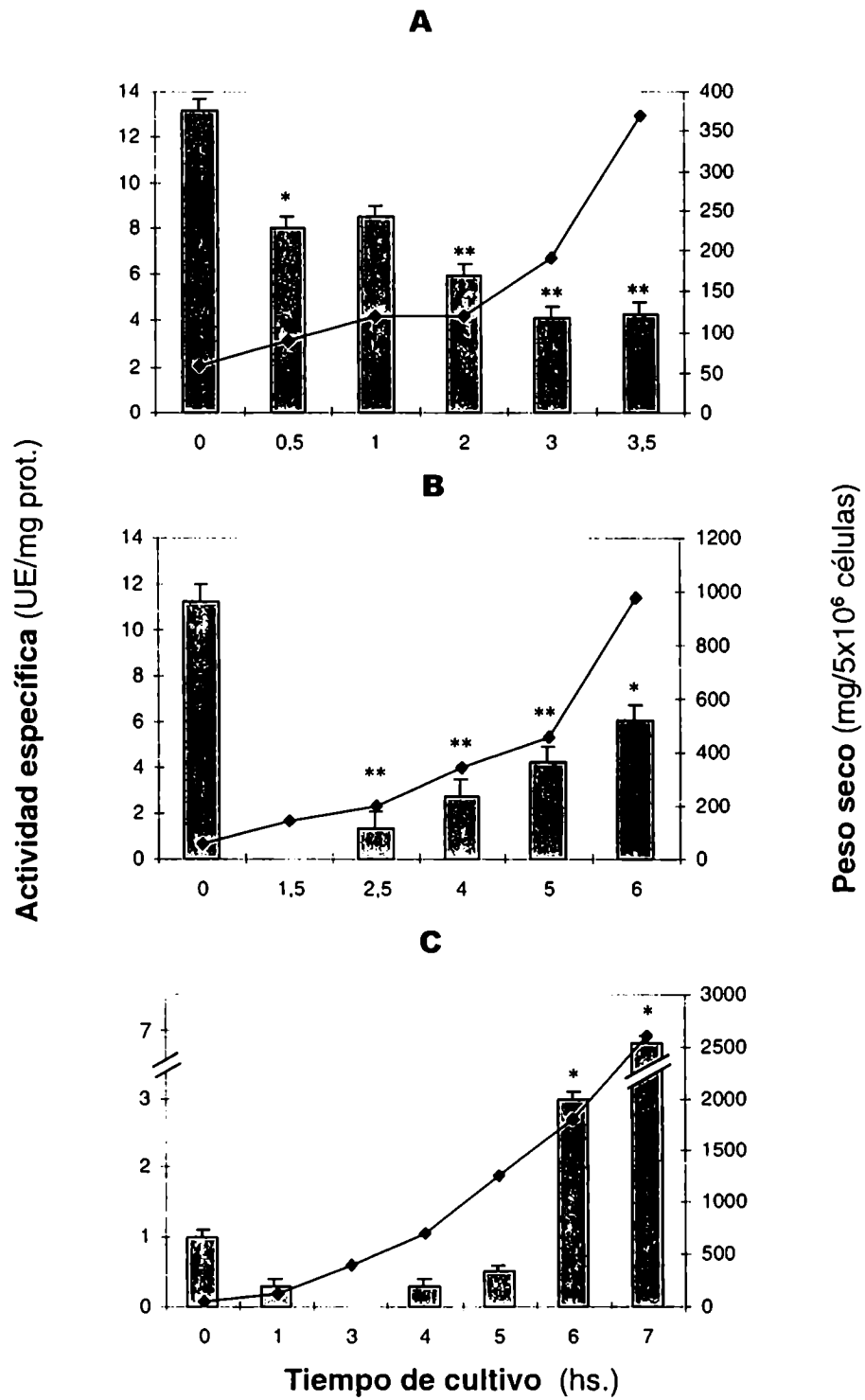
Se cultivaron y procesaron simultáneamente células provenientes de las tres condiciones nutricionales en estudio (crecimiento en DMM, DMG e YPG) cosechadas en el momento en que emitían el tubo germinativo; los resultados están volcados en la Fig.7

La Fig.7A ilustra los niveles de PKA (expresados en unidades por 10^6 células) durante la emisión del tubo germinativo para los diferentes medios de cultivo; puede observarse que los niveles varían significativamente en las diferentes condiciones nutricionales estudiadas. Sin embargo si los datos se expresan como actividad específica de la PKA (en unidades por mg de proteína; Fig 7B), se observa que no difiere significativamente en las tres condiciones estudiadas.

Hipótesis de la necesidad de una actividad "crítica" de PKA

Analizando los resultados presentados en la Tabla 9 y la Fig.7 podemos establecer la siguiente correlación: el tiempo de emisión del tubo germinativo correlaciona con el tiempo al cual el microorganismo alcanza una actividad específica de PKA a la que llamaremos "crítica".

Si dividimos la germinación en dos procesos: crecimiento y diferenciación, los cuales suceden en paralelo, podemos observar que la actividad específica de la PKA no correlaciona con el crecimiento, tal como volumen celular o proteínas totales, sino con la



**Figura 6- Actividad específica de PKA durante la germinación (barras).
 Peso seco durante la germinación (gráfico continuo).
 A) DMM; B) DMG; C) YPG. Anova seguido de Dunnett p<0,01 *; p<0,001 **.**

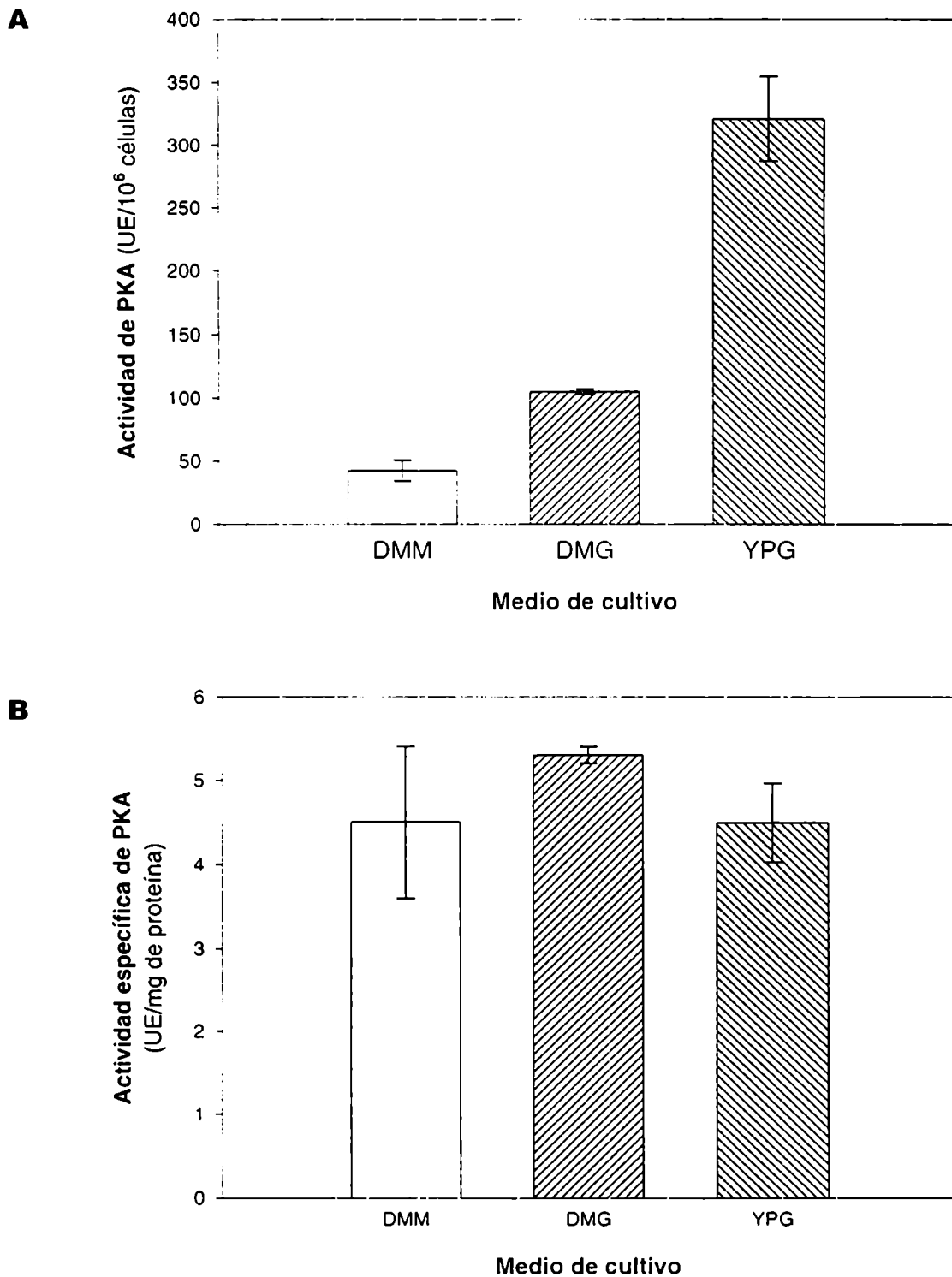


Figura 7 A) Niveles de PKA en el momento de la germinación. Anova seguido de Tukey. Todos los tratamientos fueron significativos entre sí, $p < 0,001$, $n=4$. **B) Actividad específica de PKA en el momento de la germinación.** Anova no significativo $n=4$.

diferenciación. Podemos establecer entonces, como hipótesis de trabajo, que cuanto más pobre es el medio de cultivo menor es el proceso de crecimiento y se llega antes a la actividad específica "crítica".

Si esta hipótesis es correcta, debería ser posible predecir los resultados a obtener cuando se cambia un cultivo de un medio pobre a un medio rico y viceversa, en cuanto al tiempo de emisión del tubo germinativo y la sensibilidad al efecto morfológico producido por el análogo (ver en la Tabla 7 que las concentraciones del análogo necesarias para impedir la emisión del tubo germinativo aumentan con la complejidad del medio de cultivo).

Cuando se cambia un cultivo de un medio pobre a un medio rico se favorece el proceso de crecimiento y la actividad específica de la PKA tiende a decrecer, debido al aumento de la proteína total; esto podría tener como consecuencia un retraso en la germinación y la necesidad de aumentar la concentración de dbcAMP para obtener crecimiento isodiamétrico. Por el contrario, un cambio de medio rico a medio pobre favorecería el proceso de diferenciación, incrementando la actividad específica de la PKA; se adelantaría la germinación y sería mayor la sensibilidad al análogo.

Los resultados que se muestran en la Tabla 10 son exactamente los predichos. Cuando se cambia el medio de DMG a YPG el tiempo de germinación se retrasa y la sensibilidad al análogo disminuye y sucede lo opuesto cuando el cambio se produce de un medio rico (YPG), a un medio pobre (DMG).

Dado que nuestros resultados sugieren que se alcanza una actividad "crítica" de PKA en el momento de la emisión del tubo germinativo y que es posible inhibir el crecimiento polarizado con análogos de cAMP que son activadores de la enzima o con un inhibidor de la PDE, lo cual mantiene elevados los niveles endógenos de cAMP, estudiamos la actividad de la PKA durante la germinación en presencia de análogos de cAMP o SQ 65,442, en las diferentes situaciones experimentales que habíamos analizado para caracterizar las alteraciones morfológicas.

Tabla 10 - Cambios en el medio de cultivo afectan el tiempo de emisión del tubo germinativo y la sensibilidad al cAMP

	Primera incubación 5 hs	Segunda incubación 11 hs	Tiempo de emisión (hs)	Morfología a las 16 hs
Protocolo 1	DMG	- DMG - DMG + 0,15 mM dbcAMP - YPG - YPG + 1 mM dbcAMP	5,5 NC 7-8 8	M T M M
Protocolo 2	YPG	- YPG - YPG + 1 mM dbcAMP - DMG - DMG + 0,15 mM dbcAMP - DMG + 1 mM dbcAMP	7 7 6 6 NA	M M M P T

4 ml de cultivos conteniendo 1×10^6 esporas/ml en DMG (Protocolo 1) o YPG (Protocolo 2) se cultivaron durante 5 hs ; las células se recolectaron por filtración y se resuspendieron en 4 ml de cada uno de los medios indicados \pm dbcAMP. El tiempo total de incubación fue 16 hs. Se consideró tiempo de emisión cuando el 50% de las células habían emitido el tubo germinativo. Este es un experimento representativo. Se realizaron 3 experimentos independientes con diferentes preparaciones de esporas.
NC no corresponde

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS SUBUNIDADES DE PKA EN ESPORAS CULTIVADAS EN PRESENCIA DE ANALOGOS DE cAMP

Las actividades específicas de las subunidades C y R se midieron a las 7 horas de cultivo en medio DMG (1,5 hs después de la emisión del tubo germinativo), en esporas cultivadas sin o con concentraciones crecientes de: dbcAMP, N⁶-benzoil cAMP u 8-bencilamino-cAMP. Las determinaciones se realizaron en homogenatos totales.

Los resultados están graficados en la Fig 8A donde se puede observar que en todos los casos en que los análogos alteran la morfología la actividad específica de la subunidad C se encuentra disminuida respecto del control, en forma dosis-dependiente con la concentración de análogo agregada al medio de cultivo. En el caso del 8-bencil-amino-cAMP, que no impide el crecimiento polarizado, los niveles son similares al control.

Por el contrario la actividad específica de la subunidad regulatoria permanece en los mismos niveles que el control, para todos los análogos ensayados.

En la Fig 8B están graficados los cocientes R/C para las condiciones presentadas en A; se puede observar que cada vez que la morfología está alterada el cociente R/C está aumentado.

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE C DURANTE LA REVERSION DEL EFECTO DEL dbcAMP

Las esporas fueron cultivadas durante 15 hs en medio DMG con o sin el agregado de 150 μ M de dbcAMP; en ese momento se filtraron los cultivos, se resuspendieron en medio fresco con o sin el agregado de 150 μ M de dbcAMP (control y reversión, respectivamente; ver Fig 1A, C y D) y se incubaron 3 hs más. Las determinaciones se realizaron en homogenatos totales.

Como puede observarse en la Fig.9 la actividad específica de la subunidad C está disminuida en presencia de 150 μ M de dbcAMP a las 15 hs de cultivo y aumenta inmediatamente cuando se elimina el análogo del medio de incubación y se permite el crecimiento polarizado.

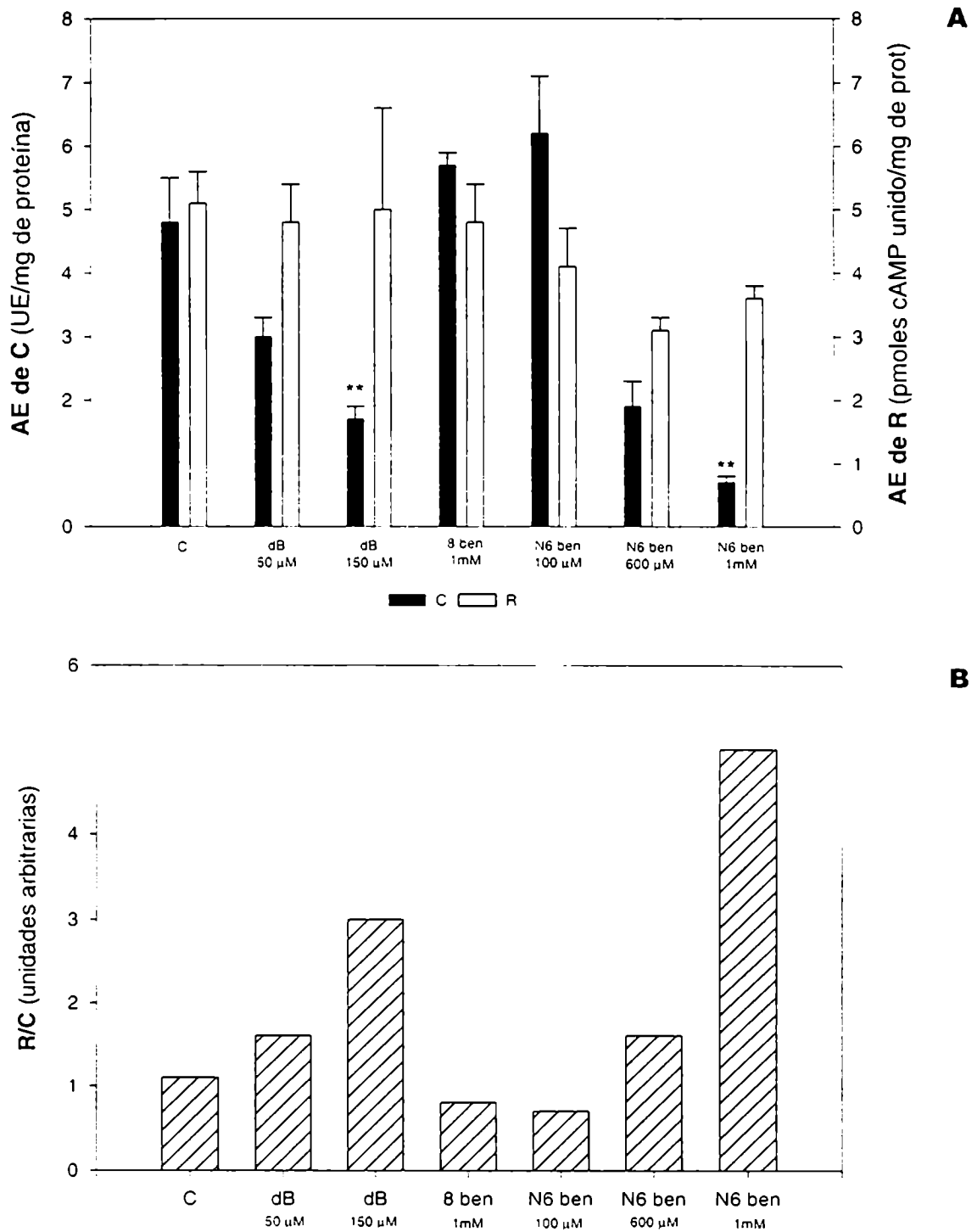


Figura 8 Actividad específica de las subunidades catalítica y reguladora de la PKA (A) C ■ Anova seguido de Dunnett $p < 0,001$ $n = 4$. R □ Anova no significativo. Cociente R/C (B) para los diferentes análogos de cAMP, 7 hs. de cultivo en medio DMG.

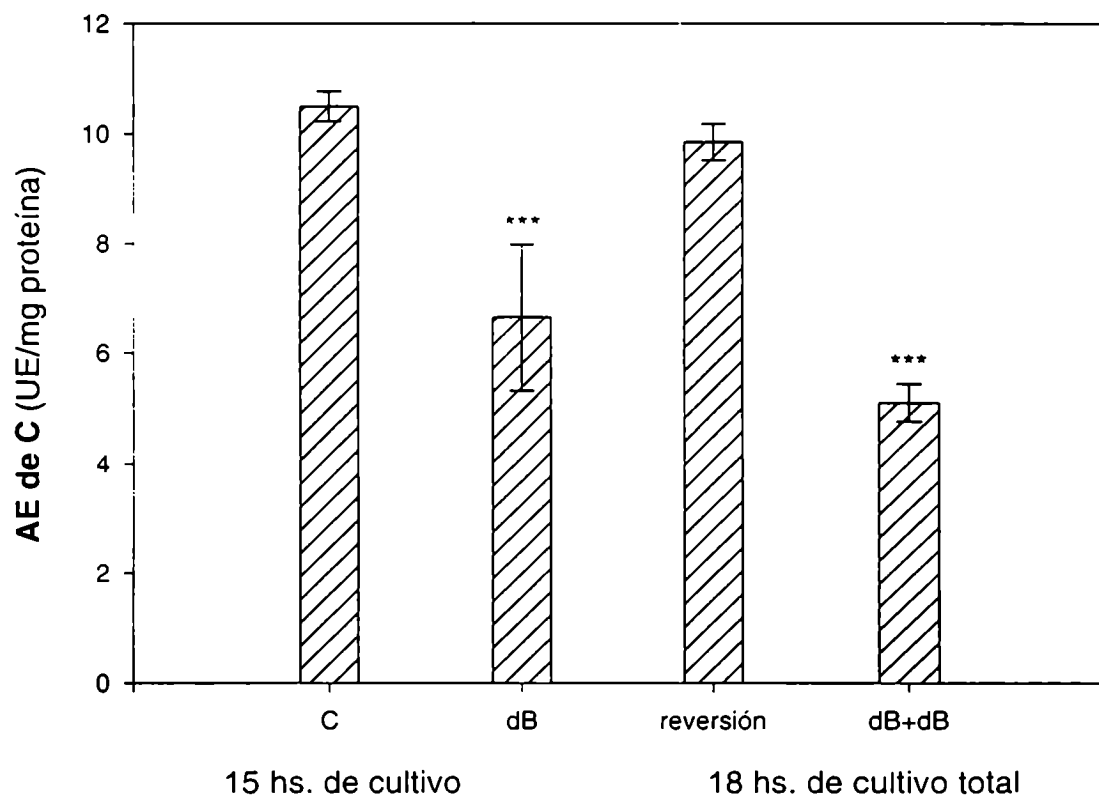


Figura 9 Actividad específica de PKA. Reversión del efecto. Anova seguido de Dunnett $p < 0,0001$ $n=4$

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS SUBUNIDADES DE PKA CUANDO SE AGREGA EL dbcAMP LUEGO DE LA EMISION DEL TUBO GERMINATIVO

Las esporas fueron cultivadas durante 6 hs en medio DMG, tiempo en el cual habían germinado; en ese momento se agregó 150 μ M de dbcAMP al medio de cultivo, prosiguiéndose la incubación 3 hs más; fueron utilizados como controles cultivos de 6 hs sin análogo y 9 hs con o sin el agregado del análogo. Las determinaciones se realizaron en homogenatos totales. La Fig 10A ilustra los resultados obtenidos; el agregado de dbcAMP luego de la germinación, que detiene el crecimiento polarizado de las hifas, produciendo el redondeo y ensanchamiento de las puntas (ver Fig 4), disminuye los niveles de la subunidad catalítica hasta aquellos exhibidos por las esporas que estuvieron las 9 hs en presencia del análogo de cAMP, con el concomitante aumento de los cocientes R/C (Fig 10B).

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS SUBUNIDADES DE PKA EN ESPORAS CULTIVADAS EN PRESENCIA DE SQ 65,442

El inhibidor de PDE SQ 65,442 agregado en concentración 0,1 mM al medio de cultivo impide el crecimiento polarizado, pero a diferencia de los análogos de cAMP también afecta el crecimiento.

El diseño experimental debió contemplar este importante efecto dado que los volúmenes celulares de las esporas cultivadas en presencia del inhibidor eran inferiores a las que se obtenían con análogos de cAMP para los mismos tiempos de cultivo. En las esporas cultivadas con análogos de cAMP se observa diferenciación sin que se afecte mayormente el crecimiento y se llega a los volúmenes máximos (con inóculos de 10^6 esp/ml) entre las 12 y 15 hs de cultivo; pero en los cultivos que contienen SQ 65,442 recién se alcanzan esos volúmenes a las 20 hs. El crecimiento está retardado por lo cual, es posible que la síntesis de proteínas relacionadas con crecimiento pueda estar disminuida y entonces la proporción de PKA frente al total de proteínas no mantenga la misma relación que en las esporas cultivadas con dbcAMP.

Teniendo en cuenta estas consideraciones se cultivaron esporas en presencia de 0,1 mM de SQ 65,442 o 150 μ M de dbcAMP durante 20 hs. Las determinaciones se realizaron en homogenatos totales. Los resultados están graficados en la Fig 11A donde puede verse que los niveles de la subunidad catalítica son similares a los controles mientras que la subunidad regulatoria está significativamente aumentada en los cultivos

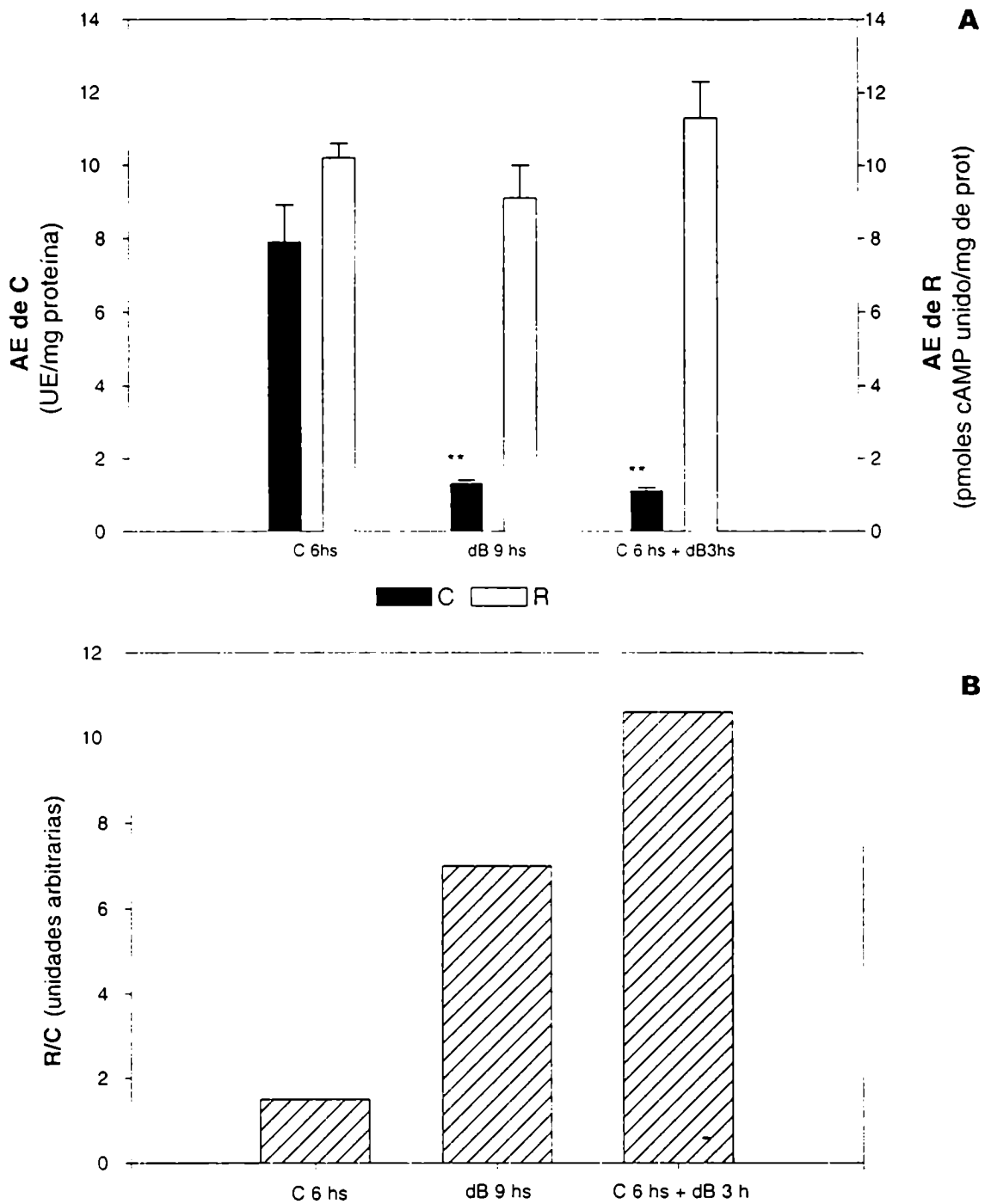


Figura 10- Actividad específica de las subunidades catalítica y reguladora de la PKA (A). Cociente R/C (B) Agregado de dbcAMP a diferentes tiempos de la germinación; 9 hs. de cultivo en medio DMG. C ■ Anova seguido de Dunnett $p < 0,001$ R □ Anova no significativo, $n=4$.

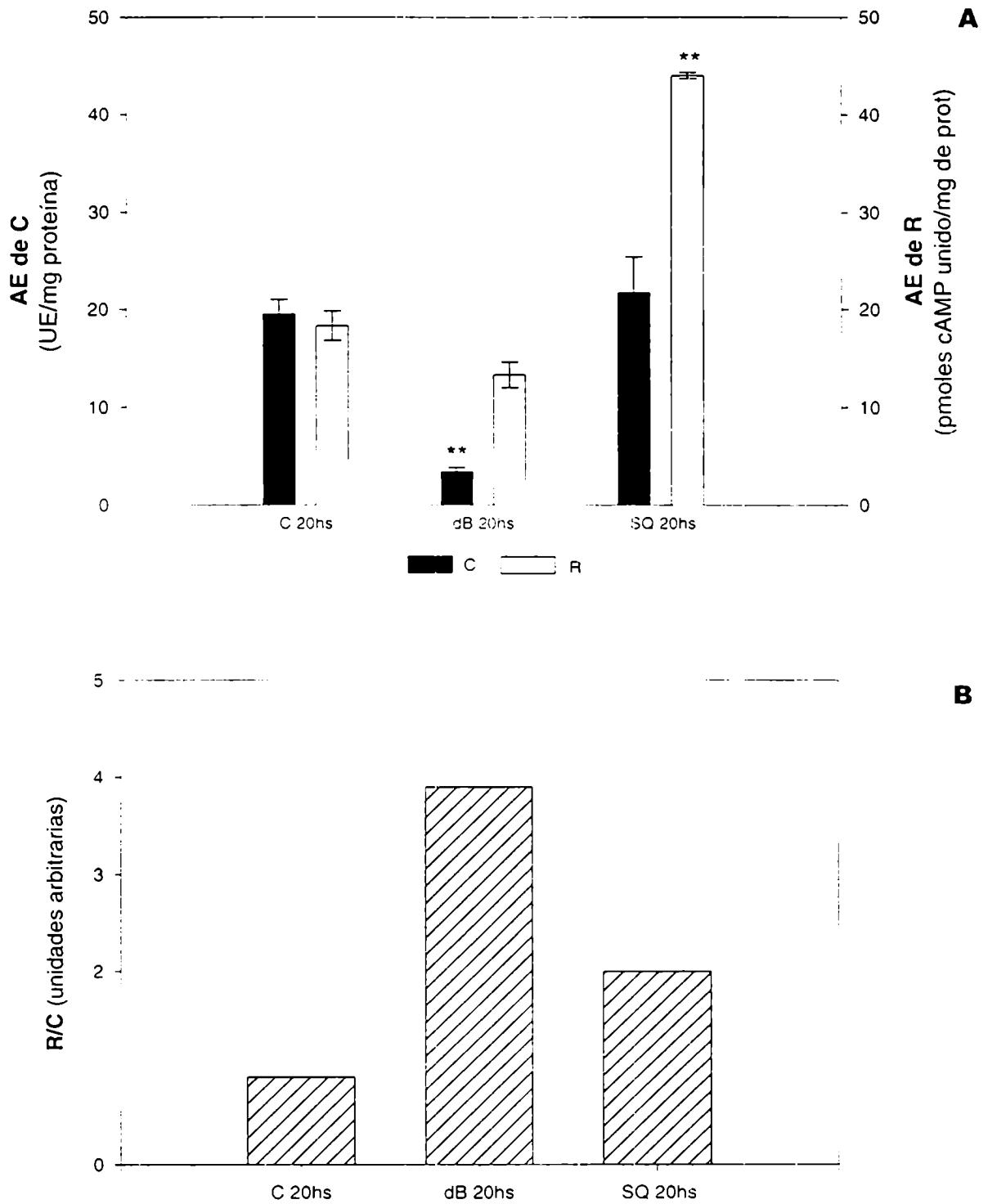


Figura 11 Actividad específica de las subunidades catalítica y reguladora de la PKA (A) Cociente R/C (B) Agregado de SQ 65,442. 20 hs. de cultivo en medio DMG. C y R Anova seguido de Dunnett $p < 0,001$ $n = 4$.

realizados en presencia de SQ 65,442. Expresando estos resultados como cocientes R/C (Fig 11B) se observa que los cocientes están aumentados en las dos situaciones en que la morfología está alterada.

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE LAS SUBUNIDADES DE PKA EN ESPORAS CULTIVADAS EN MEDIO RICO CON dbcAMP O SQ 65,442

Esporas crecidas en medio YPG con dbcAMP a dos concentraciones: 150 μ M o 10 mM, fueron cosechadas en el momento de la emisión del tubo germinativo y procesadas para determinar actividad específica de C y capacidad de unión de [3 H]cAMP a la subunidad R. Los resultados están graficados en la Figura 12A donde puede observarse que una concentración de 150 μ M, la cual no produce efecto en la morfología no afecta los niveles de PKA, mientras que una concentración de 10 mM, la máxima ensayada, la cual provoca efectos parciales, disminuye la actividad específica de C, obteniéndose cocientes R/C aumentados (Fig 12B).

En el caso del inhibidor de la PDE como ya hemos comentado, existe un efecto sobre crecimiento, por lo cual los cultivos se realizaron a tiempos mayores para asegurar que los volúmenes alcanzados por las células correspondieran a estadios post germinación, con dos controles uno en el momento de la germinación y el segundo al tiempo final de cultivo.

La Figura 13A ilustra los resultados obtenidos: nuevamente como sucedió en medio DMG, la actividad específica de C no está alterada pero la subunidad R se encuentra aumentada lo que conduce a cocientes R/C elevados (Fig 13B).

EFEECTO DE INHIBIDORES DE PKA SOBRE MORFOLOGIA

Con el objeto de observar qué efectos producía la inhibición de la actividad de la PKA, en condiciones fisiológicas, o luego de la activación que pudiera haber producido el SQ 65,442 o el dbcAMP sobre la germinación de las esporas de *M. rouxii*, se realizaron cultivos con la adición de KT 5720 y H 89, drogas que actúan como inhibidores competitivos del ATP en quinasas de proteínas; y que poseen alta especificidad para PKA, en eucariontes superiores (Kase *et al.*, 1987; Chijiwa *et al.*, 1990). Los compuestos se agregaron solos o en combinación con dbcAMP o SQ 65,442; sin embargo, como puede observarse en la Tabla 11, concentraciones de hasta 10 μ M para KT 5720 y 200 μ M para H 89 no produjeron efecto sobre la morfología.

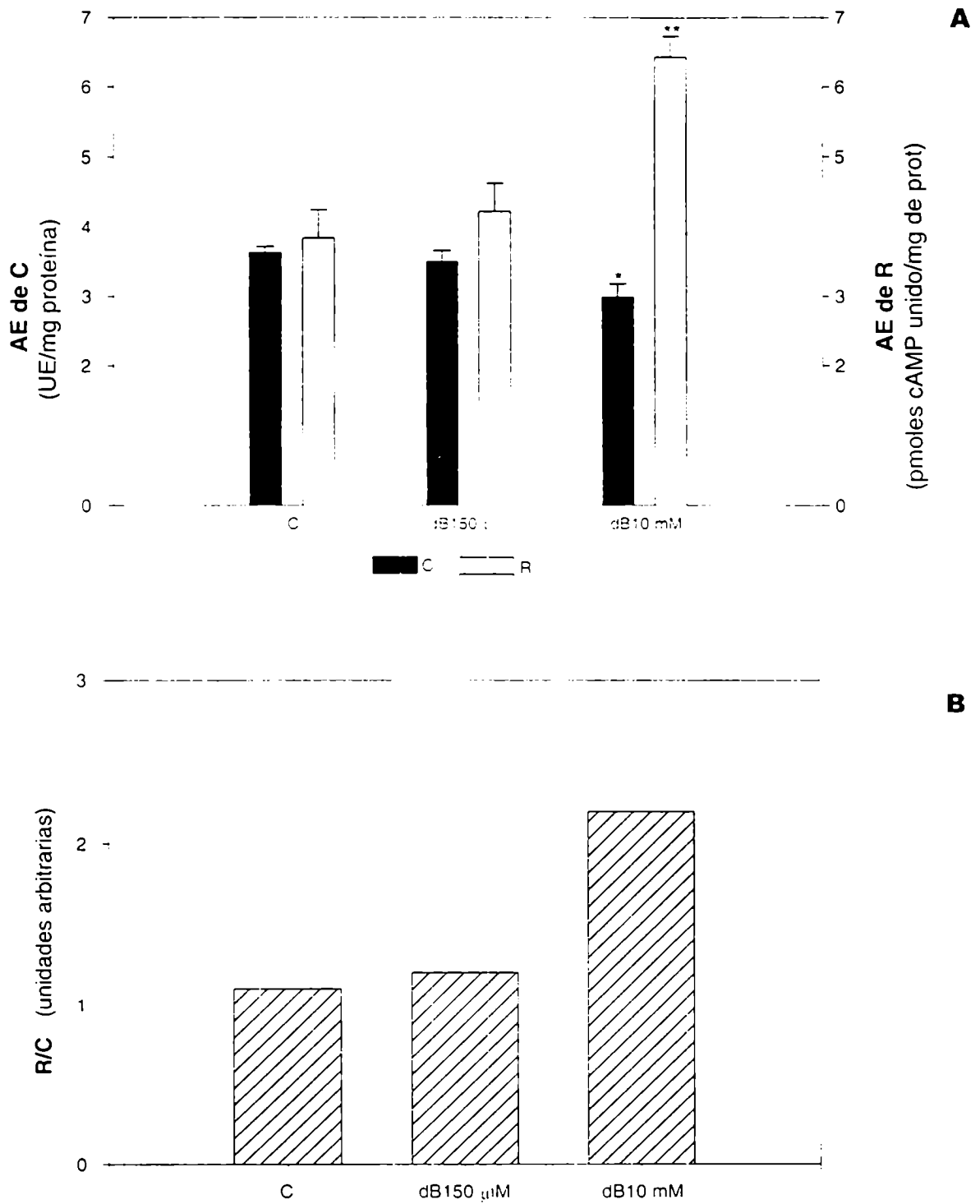


Figura 12- Actividad específica de las subunidades catalítica y reguladora de la PKA
 (A) C Anova seguido de Dunnett $p < 0,01$ $n = 4$, R Anova seguido de Dunnett $p < 0,001$ $n = 4$. Cociente R/C (B) Agregado de dbcAMP en medio YPG, 7 hs. de cultivo.

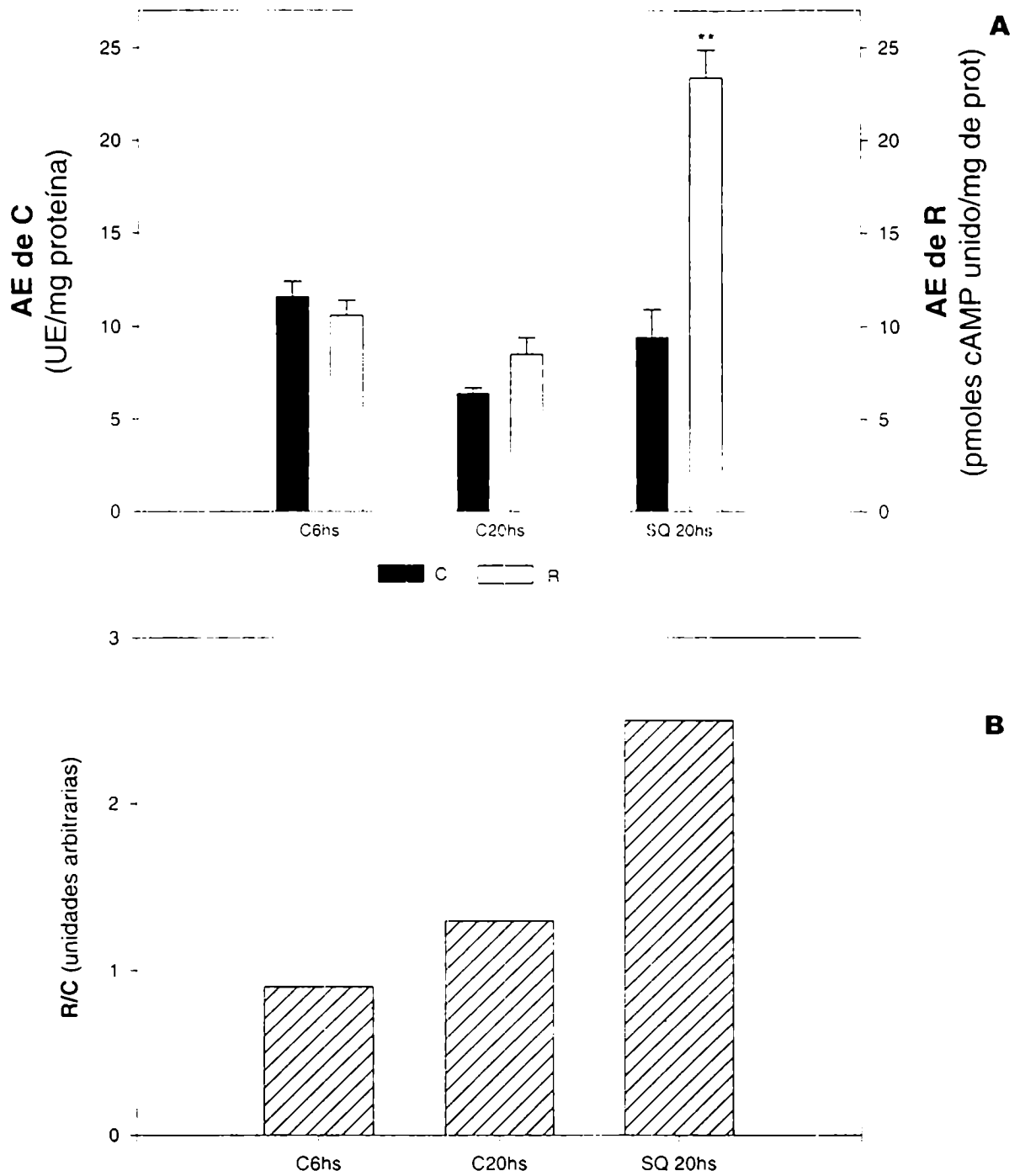


Figura 13 Actividad específica de las subunidades catalítica y reguladora de la PKA (A). Cociente R/C (B) agregado de SQ 65,442 en medio YPG, 20 hs. de cultivo. C■ Anova no significativo; R□ Anova seguido de Dunnett $p < 0,001$ $n=4$.

Tabla 11 - Efecto de inhibidores de PKA sobre morfología

Compuesto	Concentración (mM)	Morfología
KT 5720	0,0005	M
	0,005	M
	0,01	M
+ 0,1 mM SQ 65,442	0,01	T
+ 0,15 mM dbcAMP	0,01	T
H 89	0,0025	M
	0,025	M
	0,2	M
+ 0,1 mM SQ 65,442	0,1	T
+ 0,15 mM dbcAMP	0,1	T

Los compuestos se agregaron al medio de cultivo DMG al comienzo de la incubación. Las esporas se inocularon a 1×10^6 /ml y se cultivaron durante 16 hs.

En la Figura 1 A,B,C pueden observarse imágenes representativas de las morfologías mencionadas.

Se realizaron controles para estimar el efecto producido por los solventes en que fueron disueltas algunas drogas.

Los ensayos se realizaron incubando con las drogas desde tiempo cero, o agregadas poco antes de la germinación, y fueron observados a tiempos cortos luego de la germinación o luego de 16 horas de cultivo.

Se realizaron ensayos *in vitro*, para obtener el K_i de estos inhibidores en nuestro sistema, obteniéndose un K_i de 3 μM para H 89 y 17 μM para KT 5720 lo que indica que la afinidad de estos compuestos por la PKA de *M. rouxii* es entre 60 y 280 veces menor que para eucariontes superiores (50 y 60 nM respectivamente). El K_i se estimó a partir de la fórmula que lo relaciona con el IC_{50} , $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + \{S\} / K_m)$, donde K_i es la constante de inhibición del compuesto, IC_{50} la concentración que provocó el 50% de la inhibición en las condiciones del ensayo, $\{S\}$ la concentración de sustrato utilizada y K_m la constante de afinidad para la enzima. El IC_{50} para el KT 5720 fue 50 μM y para el H89 10 μM , para una concentración de ATP de 50 μM .

El Rp-cAMPS es un inhibidor competitivo del cAMP para las PKA de tipo I y II de eucariontes superiores, no es metabolizado intracelularmente, ni hidrolizado por las PDEs de alta afinidad, siendo su permeabilidad comparable a la del 8-Bromo-cAMP. Dada su utilidad potencial como inhibidor de la PKA de *M.rouxii* fue estudiado detalladamente en nuestro laboratorio (Mizyrycki, 1998) comprobándose que no se comporta como antagonista en nuestro sistema. Lo mismo sucede con el Rp 8-Br-cAMPS, otra variante más lipofílica.

Por último se probó la potencia inhibidora del péptido inhibidor, derivado de la secuencia de la proteína inhibidora de PKA, descrita en eucariontes superiores (Walsh *et al.*, 1990) el PKI-14-22 amida miristoilado. Este compuesto contiene parte de la secuencia de la PKI y está miristoilado para favorecer su permeabilidad a la membrana plasmática. Existen varios péptidos inhibidores sintéticos los cuales comprenden diferentes porciones de la PKI, el 14-22 es el menos afín, *in vitro*. En *S. cerevisiae* el PKI (6-22) tiene un K_i de 0,1 μM mientras que el 14-22 presenta un K_i de 1,4 μM (Glass *et al.*, 1992). En *M. rouxii* se ha determinado, *in vitro*, el K_i del 6-22 siendo 0,1 μM , (Guthman, 1990); no fue determinado el K_i del 14-22.

Se incubaron esporas, desde tiempo cero, en presencia de concentraciones variables de PKI desde 5 hasta 100 μM observándose las morfologías durante la germinación, varias horas después de que los controles germinaron y a las 16 hs de cultivo. El efecto observado fue una inhibición de la germinación en forma dosis dependiente, permaneciendo en el estadio de espora no hinchada a partir de 70 μM . El

efecto era transiente, reanudándose la germinación luego de algunas horas, según la concentración de inhibidor utilizada. Se realizaron controles con ácido mirístico para asegurar que el efecto observado no fuera producido por el sustituyente lipofílico, pero no se alteró la morfología de los mismos, germinando a la hora prevista.

Cuando el inhibidor se agregó antes de la emisión del tubo germinativo, también se observó inhibición dosis dependiente, las células no emitieron el tubo germinativo ni aumentaron de volumen, permaneciendo en el mismo estado que cuando se agregó el inhibidor, recuperando el crecimiento y emitiendo el tubo germinativo luego de varias horas (datos no mostrados).

ANALISIS DE LA HOLOENZIMA Y LA SUBUNIDAD R A TRAVES DE GRADIENTES DE SACAROSA

Los altos cocientes R/C observados en todas las situaciones experimentales estudiadas, despertaron nuestro interés en investigar la distribución de la holoenzima y R en extractos provenientes de esporas cultivadas con dbcAMP o SQ 65,442, por análisis a través de gradientes de sacarosa.

Dado que en nuestro laboratorio se conocía el comportamiento de la holoenzima y sus subunidades en ultracentrifugación en gradientes de sacarosa, se sometieron a esta técnica alícuotas de homogenatos totales provenientes de cultivos realizados en presencia de 150 μM de dbcAMP o 100 μM de SQ 65,442 en medio DMG inoculado a 10^6 esp./ml. Las alícuotas sembradas contenían la misma cantidad de proteína. Una vez centrifugados, los gradientes fueron fraccionados y en cada fracción obtenida se determinó actividad de PKA en presencia de cAMP y actividad de subunidad R.

El primer tiempo analizado fue 12 hs de incubación, en el cual tanto el control como las células tratadas con dbcAMP se encuentran en etapa logarítmica temprana, aunque los pesos secos de las células tratadas con el análogo ya comienzan a ser inferiores a los controles (ver Fig 2, curvas de crecimiento). La Fig 14 ilustra los perfiles obtenidos; el panel A corresponde al cultivo control en el cual el máximo de actividad de holoenzima se encuentra aproximadamente en 8,8 S y corresponde al tetrámero R_2C_2 , con un hombro no muy pronunciado hacia coeficientes de sedimentación menores. La máxima actividad ligante de cAMP de la subunidad R se encuentra centrada en 8,8 S, con un pico de menor actividad en 2,7 S correspondiente a especies proteolizadas R' y un hombro en velocidades de sedimentación intermedias correspondiente a R_2 libre.

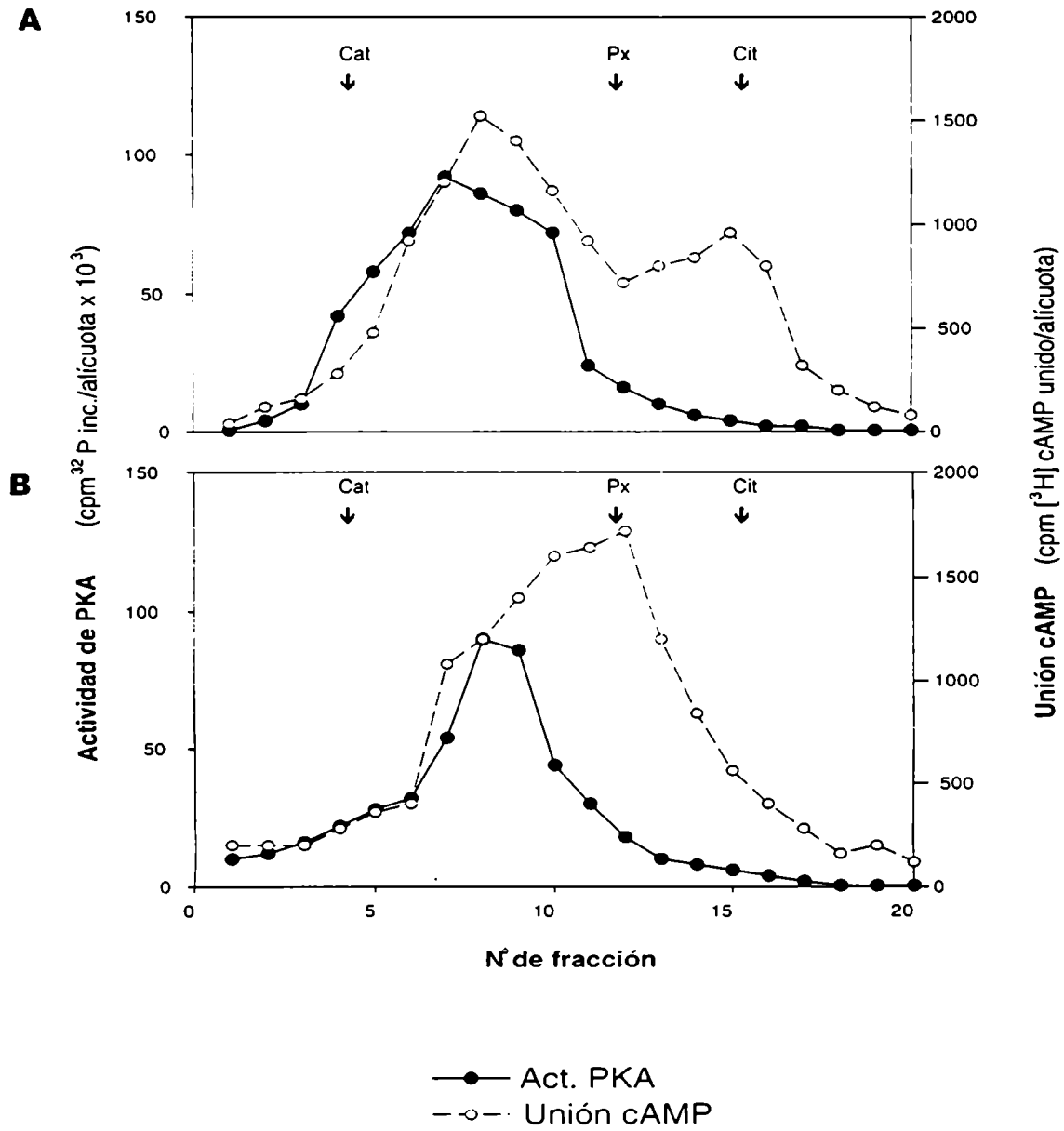


Figura 14- Sedimentación en gradientes de sacarosa de extractos obtenidos a 12 hs de cultivo. A- Control. B- 150 μM dbcAMP.

El panel B corresponde al cultivo tratado con el análogo de cAMP. El máximo de actividad de holoenzima se encuentra centrado en 8,8 S, la actividad total se encuentra disminuida con respecto al control, pero no es evidente que haya hombros hacia coeficientes de sedimentación menores. La actividad de R presenta un pico ancho único que no está ya centrado en 8,8 S como en el control, sino en 6 S, el cual representa a R_2 libre y especies parcialmente proteolizadas, con un hombro importante hacia mayores coeficientes de sedimentación correspondiente a R_2C_2 .

El segundo tiempo seleccionado fue 20 hs de cultivo para poder realizar un análisis comparativo que incluyera a las células tratadas con SQ 65,442.

A estas horas de cultivo las células control están en la última etapa del crecimiento logarítmico y las esporas cultivadas con dbcAMP están llegando a fase estacionaria (ver Fig 2, curvas de crecimiento).

En la Fig 15 están graficados los perfiles obtenidos; el panel A corresponde al control donde puede observarse que la actividad de PKA se reparte entre una especie de 8,8 S aproximadamente, y otra de 5,5 S. El pico observado a 8,8 S cosedimenta con actividad ligante de [3 H] cAMP correspondiente a la subunidad regulatoria y pertenece a la holoenzima R_2C_2 ; el pico de 5,5 S corresponde a especies diméricas R'C, donde R' es una R parcialmente proteolizada. Estas especies se observan en cultivos obtenidos de fase logarítmica tardía, tal como éste (Paveto *et al.*, 1989), donde se pone en evidencia la proteólisis resultante de procesos autolíticos. El pico principal de actividad ligante de [3 H]cAMP corresponde a una especie de 2,7 S aproximadamente, no asociada a actividad de PKA, proveniente de la proteólisis de R_2 libre o de la disociación de R'C.

El panel B corresponde a extractos provenientes de incubaciones con dbcAMP; puede observarse un pico único de 8,8 S para la holoenzima (R_2C_2), con muy baja actividad con respecto al control el cual cosedimenta con una pequeña actividad de R. La máxima actividad de R corresponde a un pico de 2,7 S de la especie R'.

El panel C corresponde a extractos provenientes de incubaciones con SQ 65,442. El pico importante de actividad de PKA se encuentra a 8,8 S aproximadamente, es del orden del control y corresponde a R_2C_2 , presenta un hombro a velocidades de sedimentación menores (R'C). La actividad de R está repartida entre la que corresponde a R_2C_2 , la que pertenece a R' del mismo orden y una amplia meseta intermedia correspondiente a R_2 dimérica.

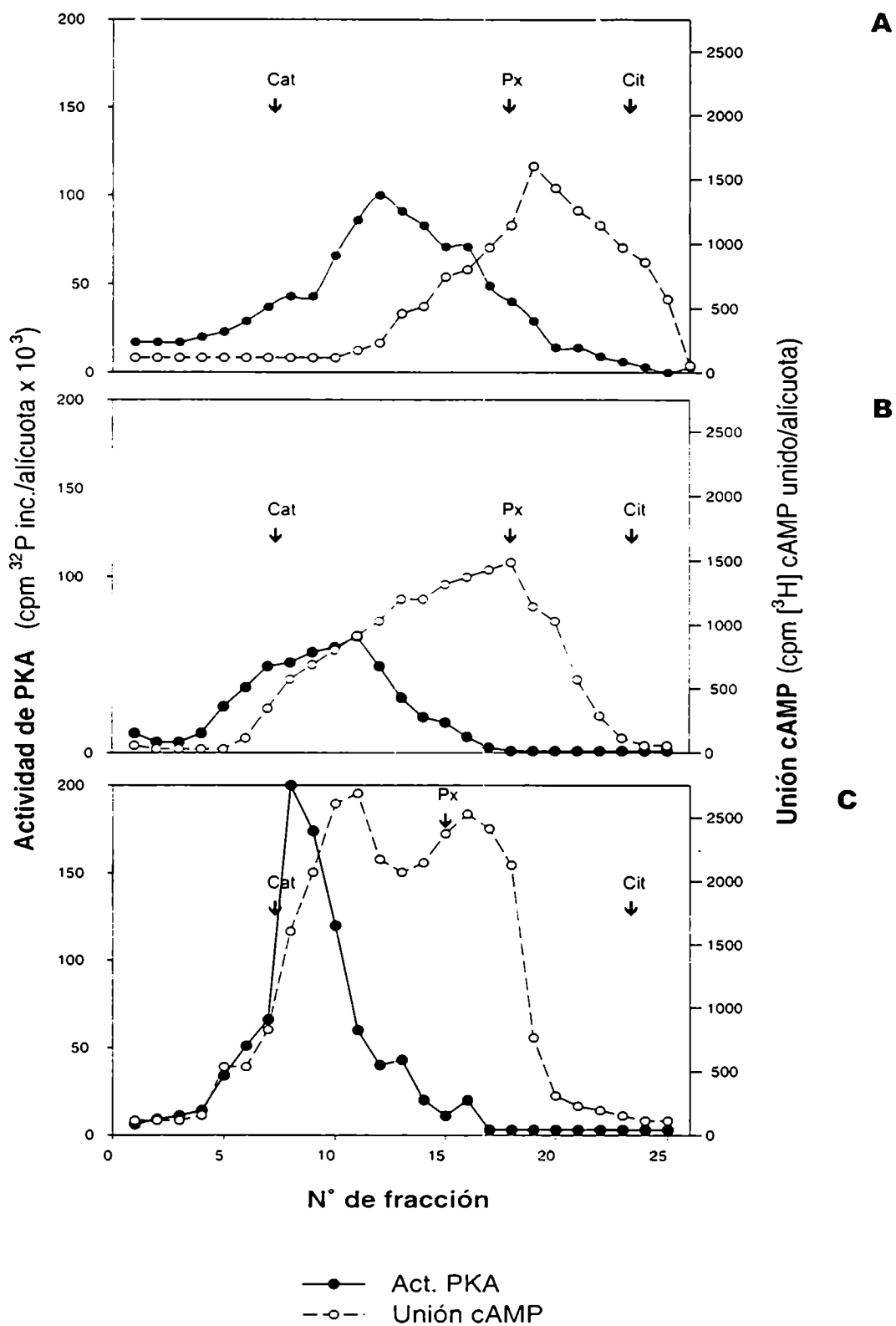


Figura 15- Sedimentación en gradientes de sacarosa de extractos obtenidos a 20 hs de cultivo. A- Control. B- 150 μM dbcAMP. C- 100 μM SQ 65,442.

En estos gradientes no está contemplada la contribución de C libre a la actividad total de la PKA ya que en las condiciones en que fueron realizados la C que podría haber estado presente en los extractos no conserva su actividad. Con el objeto de estimar la proporción de C libre presente se tomaron alícuotas de los mismos extractos utilizados para realizar los gradientes mostrados en la Figura 15, que contuvieran igual cantidad de proteínas y se sembraron en columnas de DEAE-Sepharosa, se realizaron los lavados y la elución como figura en Materiales y Métodos y se ensayó actividad de PKA en todas las fracciones.

Los resultados están graficados en la Fig.16, en donde puede observarse que para los cultivos control (Fig. 16A) la actividad de PKA se encuentra presente en las tres fracciones ensayadas, el 48% de la actividad corresponde a la holoenzima, la cual eluye con 0,35 M de NaCl, el 42% corresponde a una especie menos retenida, que eluye con 0,12 M de NaCl, y el 10% no queda retenida, eluye con el buffer de lavado y corresponde a C libre.

En los cultivos con dbcAMP (Fig. 16B), en contraste, la actividad no retenida aporta el 45% de la actividad total de PKA, la especie menos retenida contribuye con un 10% y el 45% de la actividad de PKA le corresponde a la holoenzima. La actividad enzimática total, obtenida sumando la contribución de todas las fracciones es un 38% de la actividad enzimática total del control.

Por último los cultivos con SQ 65,442 (Fig. 16C) presentan el máximo de actividad en la fracción correspondiente a la holoenzima (65%), la especie menos retenida aporta un 22% de la actividad y la fracción en la que se encuentra C aporta un 13%. La actividad enzimática total es un 65% de la actividad total del control.

DISCUSION

Cuando analizamos la actividad de PKA durante la germinación, bajo las diferentes condiciones nutricionales observamos que se llega a una actividad "crítica", la cual es independiente de la complejidad del medio de cultivo, que correlaciona con el tiempo de emisión del tubo germinativo. Estos resultados sugieren un rol para la PKA durante el proceso de diferenciación.

El estudio de la actividad de la PKA cuando las esporas se cultivan en presencia de análogos de cAMP muestra que en todas las situaciones experimentales planteadas, en las cuales se impide el crecimiento polarizado por efecto del agregado de análogos

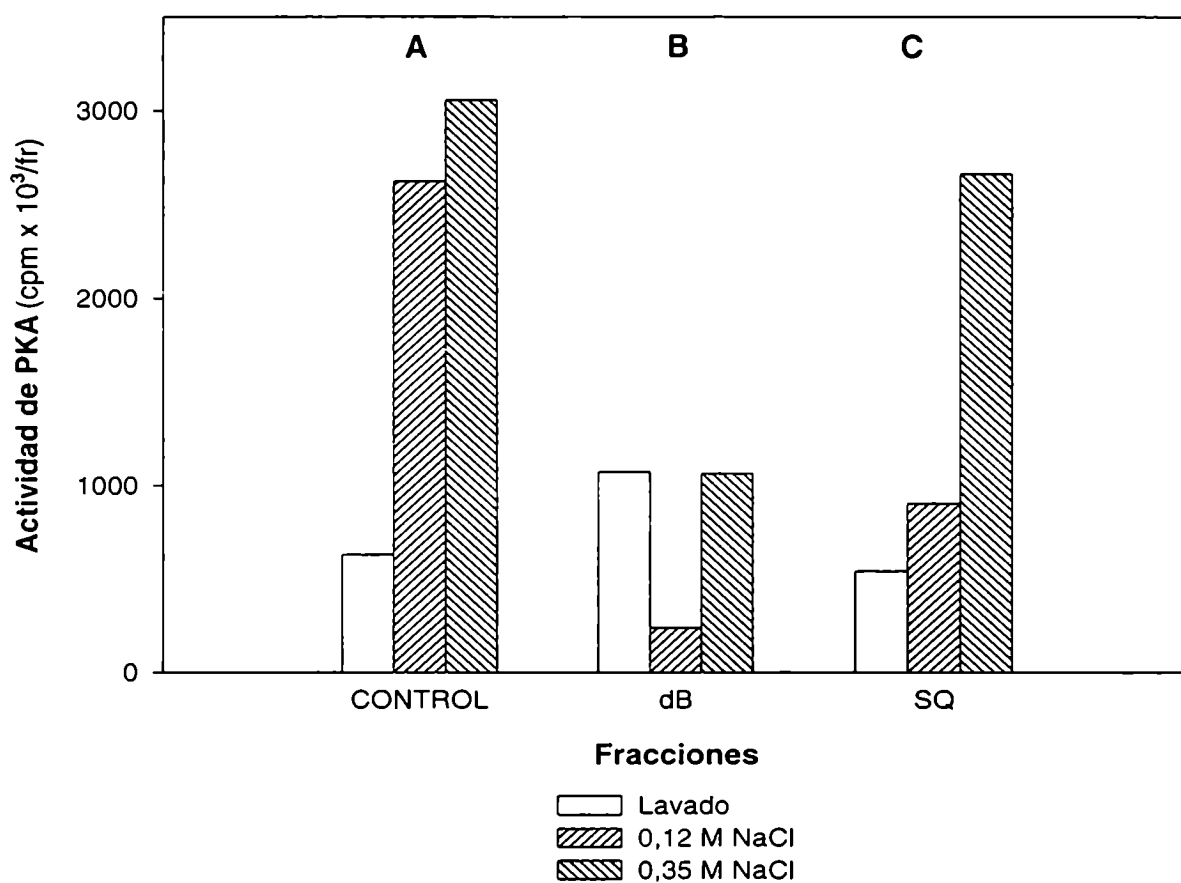


Figura 16- *Actividad específica de la subunidad catalítica de PKA*. Cromatografía en DEAE-Sepharosa de extractos obtenidos a 20 hs de cultivo.

A- Control, B- 150 μ M dbcAMP, C- 100 μ M SQ 65,442.

de cAMP, la actividad catalítica de la PKA se encuentra disminuida significativamente, mientras que la capacidad de unión de cAMP de la subunidad regulatoria permanece aproximadamente constante. En estas circunstancias hemos demostrado, para el caso del tratamiento con dbcAMP, que los niveles de cAMP están entre 7 y 10 veces más altos que los controles.

Los resultados obtenidos con SQ 65,442 también conducen a cocientes R/C aumentados, aunque en este caso, debido al efecto que la droga produce sobre el crecimiento, no es posible establecer claramente si las actividades específicas obtenidas no están influenciadas por una síntesis proteica alterada. Si así fuera, la actividad específica de las subunidades R y C no estarían referidas a la misma proteína total en los extractos provenientes de células tratadas con SQ 65,442 que en los controles o en los extractos provenientes de células tratadas con dbcAMP; por lo tanto consideramos un resultado relevante el hecho que los cocientes R/C estén alterados más que los valores absolutos obtenidos para las actividades específicas de ambas subunidades.

Analizando los resultados en forma conjunta se sugiere que la activación sostenida de la PKA producida por los altos niveles de cAMP intracelular condujo a su disociación, y posteriormente la subunidad catalítica libre pudo ser inactivada, posiblemente por proteólisis.

De manera similar se ha descrito un pico de cAMP (10 veces superior a los niveles del nucleótido en las esporas sin germinar), en los primeros 30 min de iniciada la germinación, el cual es seguido por una disminución de C, mientras que R permanece constante (Rossi *et al.*, 1994).

La disminución regulada de C ha sido descrita en varios sistemas (Houge *et al.*, 1990; Hemmings, 1986; Schwoch, 1987). Døskeland ha sugerido como la explicación más simple para este proceso, que la subunidad C libre podría ser rápidamente degradada por una actividad proteolítica ya existente en la célula (Houge *et al.*, 1990). Se ha descrito una proteasa asociada a membrana que degrada específicamente C libre, la cual no actúa cuando C está asociada a R (Alhanaty *et al.*, 1979). Otra posibilidad es que los altos niveles de cAMP activaran algún sistema proteolítico que tuviera como sustrato a C libre.

En este fenómeno de disminución regulada, la subunidad C disminuye, R permanece constante y por lo tanto la relación R/C aumenta. De consideraciones cinéticas planteadas por Døskeland surge que cuando R es constante y C disminuye, no

sólo hay menos C disponible para la activación, sino que esa cantidad de C remanente requiere mayores concentraciones de cAMP para su activación. Habría más R disponible para actuar como un reservorio para el cAMP cuando C disminuye, haciendo más difícil su disociación (Houge *et al.*, 1990).

Los inhibidores de PKA KT 5720 y H 89 tienen una afinidad muy baja por la enzima de *M. rouxii* comparada con la que presentan en eucariontes superiores esto podría explicar la falta de efectos observada. Consideramos que las morfologías observadas corresponden a falta de efecto de los compuestos sobre la PKA porque agregados desde tiempo cero tampoco logran inhibir la germinación, ya que está reportado en *M. rouxii* y en otros hongos que la PKA activada por el pico de cAMP en los primeros minutos de la incubación de las esporas con glucosa es indispensable para la germinación.

Existen algunas consideraciones a tener en cuenta acerca de los efectos observados al incubar las células con PKI. El inhibidor parece tener un efecto marcado sobre el crecimiento ya que agregado antes de la emisión del tubo germinativo mantiene a las células en los mismos volúmenes hasta que cesa el efecto.

El dbcAMP por el contrario no produce ningún efecto apreciable sobre morfología hasta el momento del establecimiento del crecimiento polarizado y tampoco ejerce efectos notables sobre los parámetros de crecimiento, en las condiciones experimentales seleccionadas para estudiar el efecto, sugiriendo que la PKA tiene un rol en la diferenciación y no en el crecimiento.

Estos resultados pueden ser interpretados de diferentes modos: si la inhibición del compuesto sobre la PKA es específica y anula completamente la función enzimática el efecto observado podría sugerir que existen otros roles para la enzima, además de los propuestos en esta tesis y que la anulación de la PKA es incompatible con la viabilidad celular. Esto sucede en *S. cerevisiae*, la cual posee tres genes que codifican para C, si se anulan dos cualesquiera de ellos la levadura sigue creciendo pero si se anulan los tres genes las células no son viables (Toda *et al.*, 1987).

Por otra parte, si la inhibición no fuera completamente específica y tuviera otros efectos no mediados por PKA los resultados no podrían ser analizados hasta que dichos efectos no fueran esclarecidos permitiendo así el diseño de experimentos que permitieran separar las diferentes contribuciones al efecto general observado. En *C. albicans* se ha reportado que el PKI inhibe la emisión del tubo germinativo (Castilla *et al.*,

1998), pero también se ha visto un efecto general inhibitorio sobre la totalidad de las fosforilaciones que se observan en el organismo, luego del agregado del compuesto (Castilla *et al.*, 1996).

Por lo tanto creemos que el efecto del PKI sobre la germinación no está establecido con claridad y es necesario un estudio más profundo de sus mecanismos de acción para asegurar su especificidad sobre la PKA de eucariontes inferiores.

Ninguno de los inhibidores estudiados resultó adecuado para esclarecer la función de la PKA en la emisión del tubo germinativo.

La distribución de la holoenzima y la subunidad regulatoria en los gradientes correspondientes a los controles cultivados 12 hs ilustra el inicio de procesos de degradación de R_2C_2 , con aparición de especies R'C parcialmente proteolizadas, evidenciados por el hombro que se observa en el gradiente hacia coeficientes de sedimentación menores que 8,8 S. Los cultivos control que recién comienzan su etapa de crecimiento logarítmico (7 hs de cultivo) presentan su máximo de actividad centrado en 8,8 S, el cual cosedimenta con la actividad ligante de cAMP (Rossi y Moreno, 1994).

No se observa esto en los cultivos tratados con dbcAMP, la actividad de holoenzima está disminuida con respecto al control, pero sigue centrada en 8,8 S, la actividad de R se encuentra desplazada hacia coeficientes de sedimentación menores, lo cual sugiere que la estimulación sostenida con cAMP disoció la holoenzima y R_2 libre comenzó a sufrir procesos de proteólisis.

En los perfiles de los gradientes de 20 hs son más notorios los procesos de proteólisis. La distribución de especies en el gradiente correspondiente al control es idéntico al reportado por Rossi y Moreno (1994) para un extracto proveniente de esporas, refleja por lo tanto el perfil de un cultivo envejecido. Se observa un aumento importante de las especies R'C y un notorio desplazamiento de las especies correspondientes a R hacia coeficientes de sedimentación bajos.

Las células crecidas con dbcAMP presentan una disminución más marcada de la especie R_2C_2 que sigue centrada en 8,8 S y una acumulación de especies monoméricas proteolizadas de R, que pueden ligar cAMP, pero que tienen disminuida su capacidad de interactuar con C.

Las células cultivadas con SQ 65,442 si bien tienen una buena actividad de holoenzima contienen el doble de concentración de especies R_2 y R' capaces de ligar

cAMP, para la misma cantidad de proteínas. Nótese la similitud entre este perfil y el obtenido con células incubadas 12 hs en presencia de dbcAMP.

La purificación enzimática por cromatografía discontinua en DEAE-Sepharosa realizada para estimar la contribución de C libre, de extractos crudos de 20 hs de cultivo, refleja con buena aproximación los perfiles que se observan en los gradientes. Únicamente en el caso de los cultivos con dbcAMP es importante la contribución relativa de C libre; aun considerando el aporte de C a la actividad total de PKA, los niveles se encuentran reducidos en un 62% con respecto al control.

Si bien, una vez purificada, la subunidad C es estable en solución, no puede descartarse una inactivación de C por proteólisis durante el procesado de las muestras.

Los resultados presentados sugieren que la estimulación sostenida de la vía de transducción de señales por cAMP tiene un efecto negativo sobre la actividad y la activación de la PKA.

Por lo tanto podría inferirse que la falta de crecimiento polarizado es la consecuencia de una disminución en el estado de fosforilación de proteínas clave.

Sin embargo algunas evidencias hacen surgir dudas sobre estas conclusiones. En esporas, Rossi y Moreno (1994) reportaron que los cocientes R/C están aumentados 6 veces, como resultado de las altas concentraciones de una especie R', derivada probablemente de la proteólisis de R₂. En este sistema la actividad de la holoenzima se halla muy inhibida a juzgar por las grandes diluciones que hay que realizar para obtener una actividad enzimática lineal en extractos crudos.

Cuando se analiza la capacidad de la holoenzima para ser activada endógenamente por el cAMP se comprueba que el aumento de 10 veces en la concentración de cAMP, que se observa al comienzo de la germinación, produce la activación y posterior degradación de la subunidad C. Por lo tanto es posible activar la holoenzima, en algunas situaciones, por el aumento de cAMP a pesar del cociente R/C desfavorable.

Se desconoce cuál es el mecanismo de degradación de C en *M. rouxii*, sabemos que no es posible estimar la proporción de C en extractos crudos debido a las altas diluciones que es necesario realizar para obtener linealidad, lo que conduce a una disociación espontánea de la holoenzima. También sabemos que si se promueve, *in vitro*, la disociación de C en extractos parcialmente purificados por gradiente de

sacarosa, o por columna de afinidad en cAMP-agarosa, la subunidad C es estable varias horas en solución, aunque no resiste el congelamiento.

Cuando utilizamos extractos crudos tratamos de optimizar las condiciones para preservar a C utilizando inhibidores de proteasas en el buffer de extracción y de incubación, trabajando en frío y realizando todas las operaciones en el menor tiempo posible, pero ese tiempo nunca pudo reducirse a menos de 30 minutos, contados desde el momento de la ruptura celular hasta el momento de la incubación.

También trabajamos en condiciones de asegurar que la medición de la holoenzima no se viera inhibida, realizando una incubación previa con carbón para eliminar el nucleótido cíclico intracelular que pudiera estar presente, el cual podría inhibir la determinación enzimática por ser un análogo competitivo del ATP. Trabajamos con extractos totales y solubles, para estimar la posible contribución de una especie asociada a membranas; sabemos que la PKA se encuentra en la fracción soluble pero deseábamos saber si existía traslocación por efecto de la incubación con los análogos, pero no obtuvimos diferencias entre ambas situaciones experimentales.

Por lo tanto creemos, *bona fide*, que la estimación de la holoenzima refleja los niveles que existen en las células, aunque no podemos descartar que exista una rápida inactivación de la subunidad C al realizar la extracción, ya que se ha reportado que los hongos poseen proteasas extremadamente potentes y muy difíciles de inhibir.

Por lo tanto, con la metodología utilizada, no nos es posible discernir entre las dos posibilidades opuestas a saber :

- la estimulación sostenida de la PKA, producida por los altos niveles intracelulares del nucleótido cíclico producen la disociación de la enzima, seguida por la inactivación de la subunidad C. Esto conduce a cocientes R/C aumentados; en tal situación la activación de la enzima remanente requeriría concentraciones aún más elevadas de cAMP. El efecto observado, entonces, es la consecuencia de la falta de fosforilación de proteínas clave, necesarias para la emisión y/o el mantenimiento del crecimiento polarizado.

- la estimulación sostenida de la PKA producida por el nucleótido cíclico conduce a la fosforilación de proteínas clave, las cuales deben permanecer desfosforiladas para ejercer su acción.

Existe una tercera posibilidad no contemplada por las posiciones extremas anteriormente planteadas y es que la polaridad celular requiera de mecanismos altamente regulados tanto para su mantenimiento como para modificar la dirección de la

polarización o la apertura de ramas laterales. El crecimiento de la hifa no sigue una dirección única, cambia de dirección y produce ramas laterales según mecanismos que no están determinados y que deben responder a estímulos externos tales como la búsqueda de nutrientes y la necesidad de penetrar sustratos.

Por lo tanto el rol de la PKA en la morfogénesis puede ser la modulación por fosforilación de proteínas que puede ser que necesiten estar fosforiladas en algunos momentos y en otros no.

El estudio de tales mecanismos excede los objetivos de esta tesis.

Se han reportado, en hongos, observaciones que sugieren que la PKA puede cumplir cualquiera de los roles propuestos, según el organismo considerado.

En *Neurospora crassa*, mutantes termosensibles de la subunidad regulatoria, cuando crecen a la temperatura restrictiva, no pueden mantener el crecimiento polarizado y crecen isodiamétricamente, la fragilidad celular está aumentada y no puede ser compensada por el agregado de estabilizantes osmóticos. Por inferencias indirectas deducen también que la pared celular está engrosada. (Bruno *et al.*, 1996). Por lo tanto en este caso altos niveles de C impedirían el crecimiento polarizado (el enfoque es genético, no realizaron determinaciones bioquímicas).

En *Candida albicans* el agregado de inhibidores específicos para PKA en eucariontes superiores tales como H89 y el péptido inhibidor miristoilado PKI 5-24, impiden la emisión del tubo germinativo sugiriendo que una PKA activa es necesaria para el crecimiento polarizado (Castilla *et al.*, 1998).

Ustilago maydis, es un hongo patógeno de plantas, crece como saprófito haploide con morfología levaduriforme en medio de cultivo sólido, el cual luego de la diferenciación sexual forma el diploide que crece como micelio y es patógeno de plantas. En este caso la PKA parece estar involucrada tanto en la morfogénesis como en la diferenciación sexual y en la virulencia asociada con ella. Esto se deduce de resultados que indican que mutaciones en el gen que codifica para la isoforma mayoritaria de C produce crecimiento filamentoso, este micelio es haploide y puede crecer en medio de cultivo sólido y no en maíz, pero mutaciones en el gen que codifica para R también produce crecimiento filamentoso y es haploide, aunque este micelio tiene la capacidad de crecer sobre maíz pero no puede penetrar el tejido. Por lo tanto en este organismo la regulación de los diferentes roles que cumple la PKA parece crucial

para el establecimiento de una morfología funcional (Gold *et al.*, 1997; Durrenberger *et al.*, 1998).

EFFECTO DE ANALOGOS DE cAMP SOBRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y LA PARED CELULAR DE *MUCOR ROUXII*

EFFECTO DE CITOCALASINA A SOBRE MORFOLOGIA

Uno de los efectos más notables de los análogos de cAMP sobre la morfología de *M. rouxii* además del crecimiento isodiamétrico, es el engrosamiento de las hifas, que puede observarse en los efectos parciales; la célula madre también aumenta de volumen, en algunas ocasiones pueden verse células encadenadas como "rosarios" que corresponden a una célula madre con un tubo germinativo de poca extensión que se ha septado, situación completamente anómala ya que este hongo presenta hifas cenocíticas. La única situación conocida en la que se producen septos es cuando ante situaciones nutricionales adversas las puntas de las hifas se septan para dar lugar a la formación de artrosporas (Orlowski, 1991).

La inhibición del crecimiento polarizado puede obtenerse también luego de la germinación dando lugar nuevamente a estructuras redondeadas, con fuertes engrosamientos en las puntas y en la célula madre.

Todos estos efectos son reversibles y el crecimiento polarizado se reanuda inmediatamente después de cambiar el medio de cultivo por medio de cultivo sin análogo.

Las morfologías y situaciones descritas corresponden exactamente a los efectos descritos en la literatura cuando se incuban esporas, levaduras o micelio con citocalasinas, conocidos inhibidores de la filamentación de actina. Estos efectos han sido reportados en: *Botrytis cinerea* (Betina *et al.*, 1972), *Neurospora crassa* (Allen *et al.*, 1980), *Gilbertella persicaria* (Grove *et al.*, 1980), *Mucor mucedo* (El Moughith *et al.*, 1984) y *Candida tropicalis* (Kobori *et al.*, 1992) entre otros. En todos los casos se detuvo el crecimiento de las hifas y las puntas se hincharon y redondearon. También se han reportado algunos efectos débiles con citocalasina B y D en *M. rouxii* (Sabanero, 1994).

Las citocalasinas forman una familia de compuestos de origen fúngico los cuales son potentes venenos celulares (Cooper, 1987). Actúan sobre los microfilamentos, impidiendo la polimerización al unirse a uno de los extremos de crecimiento.

Las diferencias morfológicas presentadas por las especies fúngicas reportadas así como la diversidad de citocalasinas y situaciones experimentales ensayadas permitían intuir, pero no confirmar, la morfología que adoptarían las esporangioesporas de *M. rouxii*, en proceso de germinación, cuando se las incubara con citocalasinas. Se eligió trabajar con citocalasina A por ser el más potente inhibidor de la polimerización de actina en hongos (El Mougith *et al.*, 1984).

Este compuesto afecta también los procesos de crecimiento porque se ha descrito que inhibe el transporte de glucosa en *S. cerevisiae*, (Kuo *et al.*, 1975), razón por la cual se variaron las condiciones experimentales para obtener los efectos morfológicos con un mínimo compromiso en el crecimiento. El compuesto se agregó poco tiempo antes de la emisión del tubo germinativo, y la observación microscópica de la morfología se realizó dos horas después de que se produjera la germinación en los cultivos control. Cuando fue necesario observar morfologías luego de prolongados tiempos de cultivo, se agregó al medio de incubación una alícuota adicional de citocalasina, ya que esta droga es inestable en agua y precipita luego de algunas horas.

En la Figura 17 puede observarse el efecto dosis dependiente de citocalasina A sobre la morfología en cultivos realizados en DMG; nótese la similitud en los efectos parciales entre dbcAMP y citocalasina A (Fig. 17 A vs C).

Se obtuvieron los mismos efectos cuando la incubación se realizó en YPG o en DMM, pero en este último caso la fuerte inhibición en el crecimiento dado por la pobreza del medio obligó a prolongar el tiempo de la incubación para asegurar que el volumen celular fuera superior al de la espora prebrotada. Si la droga se agrega luego de la emisión del tubo germinativo cesa el crecimiento polarizado y las hifas en crecimiento se redondean y engrosan. Todos los efectos son reversibles (datos no mostrados).

EFFECTO DE LOS ANALOGOS DE cAMP SOBRE LA POLIMERIZACIÓN DE ACTINA

Con el objeto de observar el estado de organización del citoesqueleto de actina en esporas en proceso de germinación, cultivadas en presencia de dbcAMP, se incubaron células permeabilizadas provenientes de cultivos con o sin el agregado de 150 μM de dbcAMP con FITC-faloidina; tal como se describe en Materiales y Métodos. La faloidina es un compuesto producido por hongos que se une a la actina polimerizada impidiendo su despolimerización; al estar marcada con FITC es posible observar los microfilamentos por microscopía de fluorescencia.

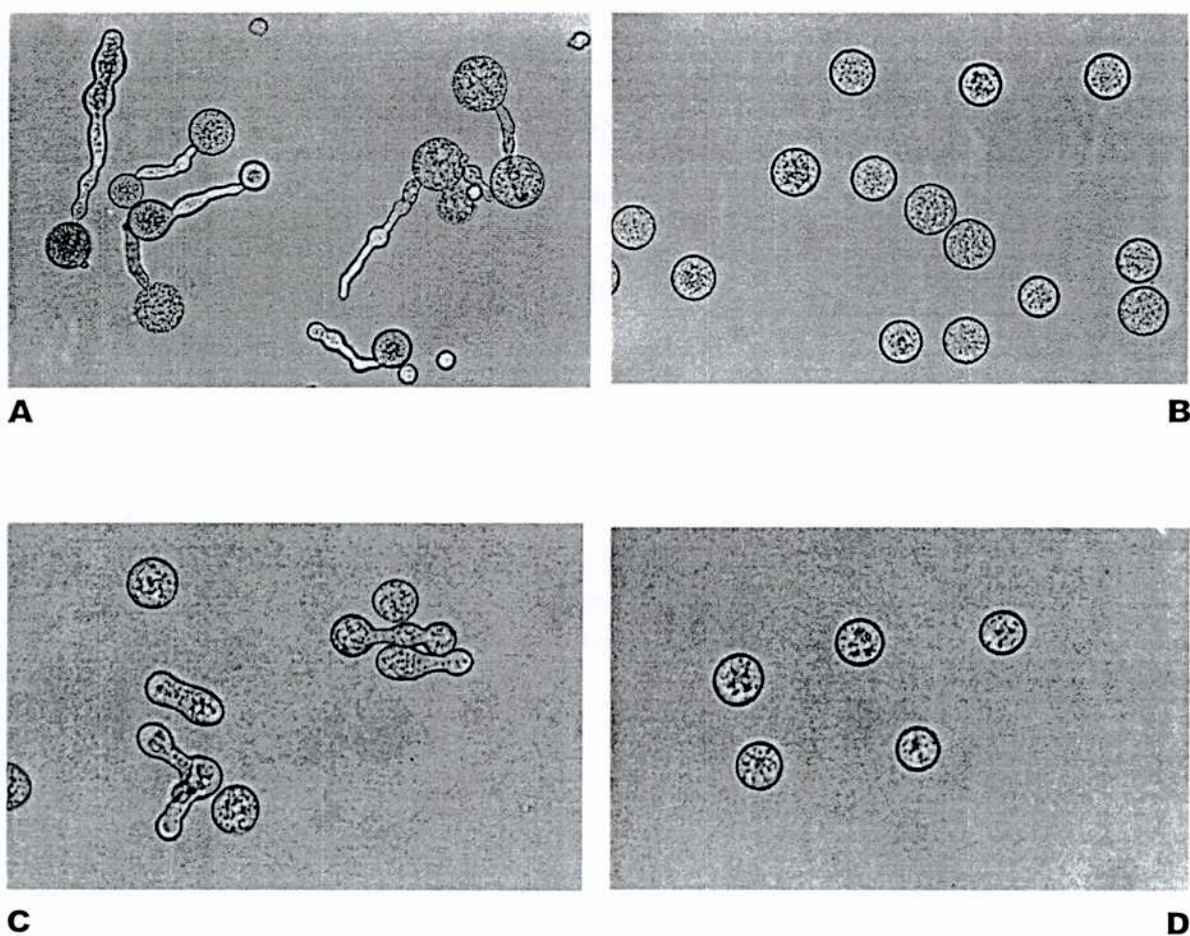


Figura 17- Efecto de citocalasina A sobre morfología. Medio DMG, 16 hs de cultivo. **A-** dbcAMP 50 μ M. **B-** dbcAMP 150 μ M. **C-** Citocalasina A (5 μ g/ml) **D-** Citocalasina A (10 μ g/ml).
Aumento: 1 cm= 28 μ m.

Los resultados se muestran en la Fig. 18; las células provienen de cultivos de 7 hs en medio DMG. En las células control (Fig. 18A) se ven puntos brillantes en la célula madre y finos haces de actina en los tubos germinativos, tal como se ha descrito en células recién germinadas de *M. rouxii* (Hasek y Bartnicki- García, 1994); por el contrario en las células tratadas con dbcAMP (Fig. 18B) no se observan estructuras y la fluorescencia es menor.

ULTRAESTRUCTURA DE LA PARED DE *MUCOR ROUXII*

La fragilidad de las esporas crecidas con análogos de cAMP aumenta con el tiempo de incubación para un dado inóculo y es más notorio en esporas crecidas a baja densidad celular.

Pueden observarse alteraciones morfológicas, aún al microscopio óptico, en la superficie de las células cultivadas más de 20 horas. Nótese en la Figura 19 que la superficie celular parece replegada. Estas características nos condujeron a realizar observaciones sobre la ultraestructura del hongo.

Se cultivaron esporas a diferentes tiempos; 7 horas para el control y 7 , 12, 15 o 18 horas para las células tratadas con 150 μ M de dbcAMP y se procesaron según los protocolos que figuran en Materiales y Métodos.

No se observan alteraciones morfológicas en las células cultivadas con el análogo luego de dos horas del tiempo de emisión del tubo germinativo (7 horas de cultivo), pero cuando el tiempo de incubación aumenta (12 horas de cultivo) la pared está engrosada, con respecto al cultivo de 7 horas (las paredes de la hifa crecida en situaciones control no se engrosan a medida que avanza el tiempo de cultivo, ya que el crecimiento sucede en las puntas). El aumento no es homogéneo ya que muestra zonas de diferente espesor, con engrosamientos que se proyectan profundamente hacia el citoplasma (Figura 20 A y B). La deposición del material en los engrosamientos no es homogénea, presenta zonas de diferente densidad electrónica. Se observan alteraciones similares, en donde el espesor de la pared celular se encuentra aún más aumentado, en células cultivadas por períodos más prolongados (Datos no mostrados) .

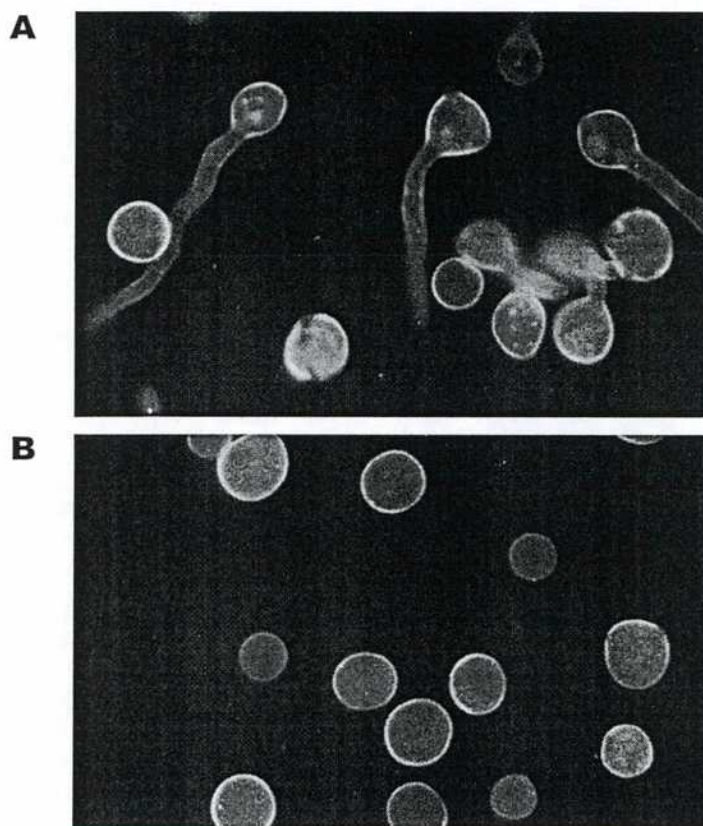


Figura 18- Microscopía de fluorescencia. Tinción con FITC- faloidina. A- Control, 7 hs de cultivo. B- dbcAMP 150 μ M, 7 hs de cultivo. **Aumento:** 1 cm= 14 μ m.

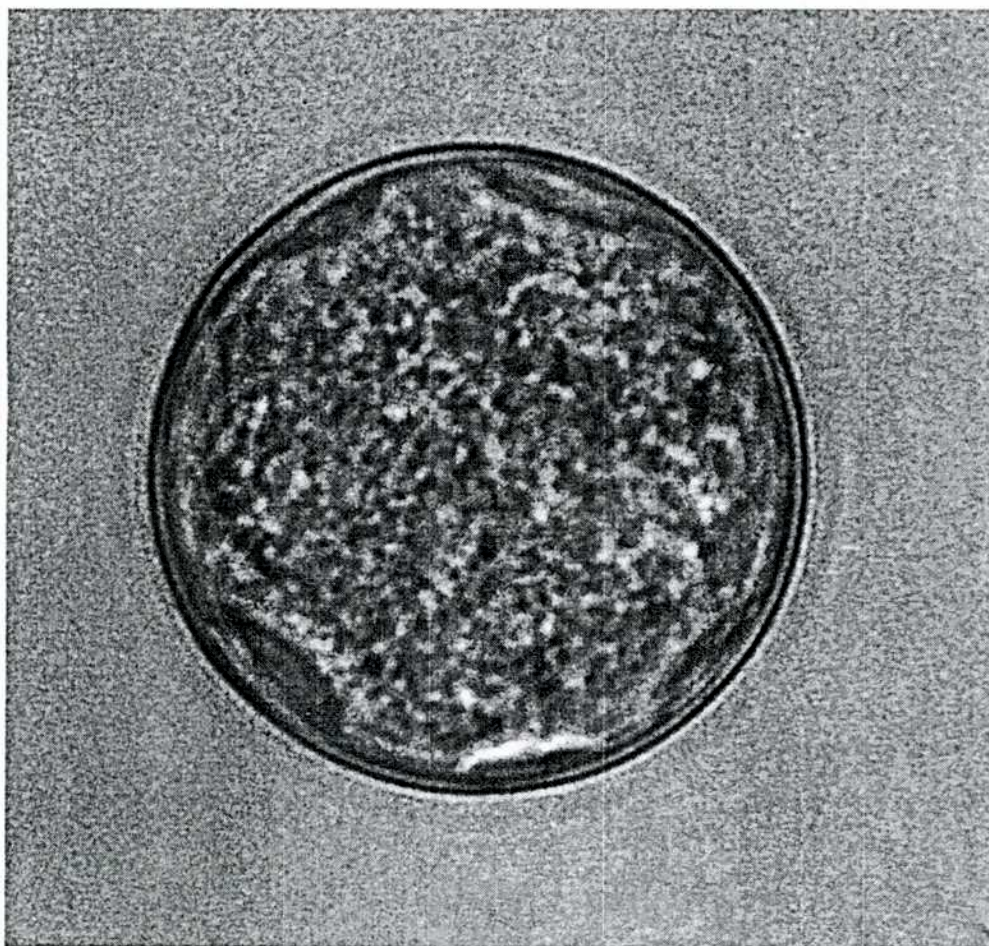


Figura 19- Microscopía óptica. dbcAMP 300 μ M 10^5 esporas/ml, 30 hs de cultivo.
Aumento: 1cm=60 μ m.

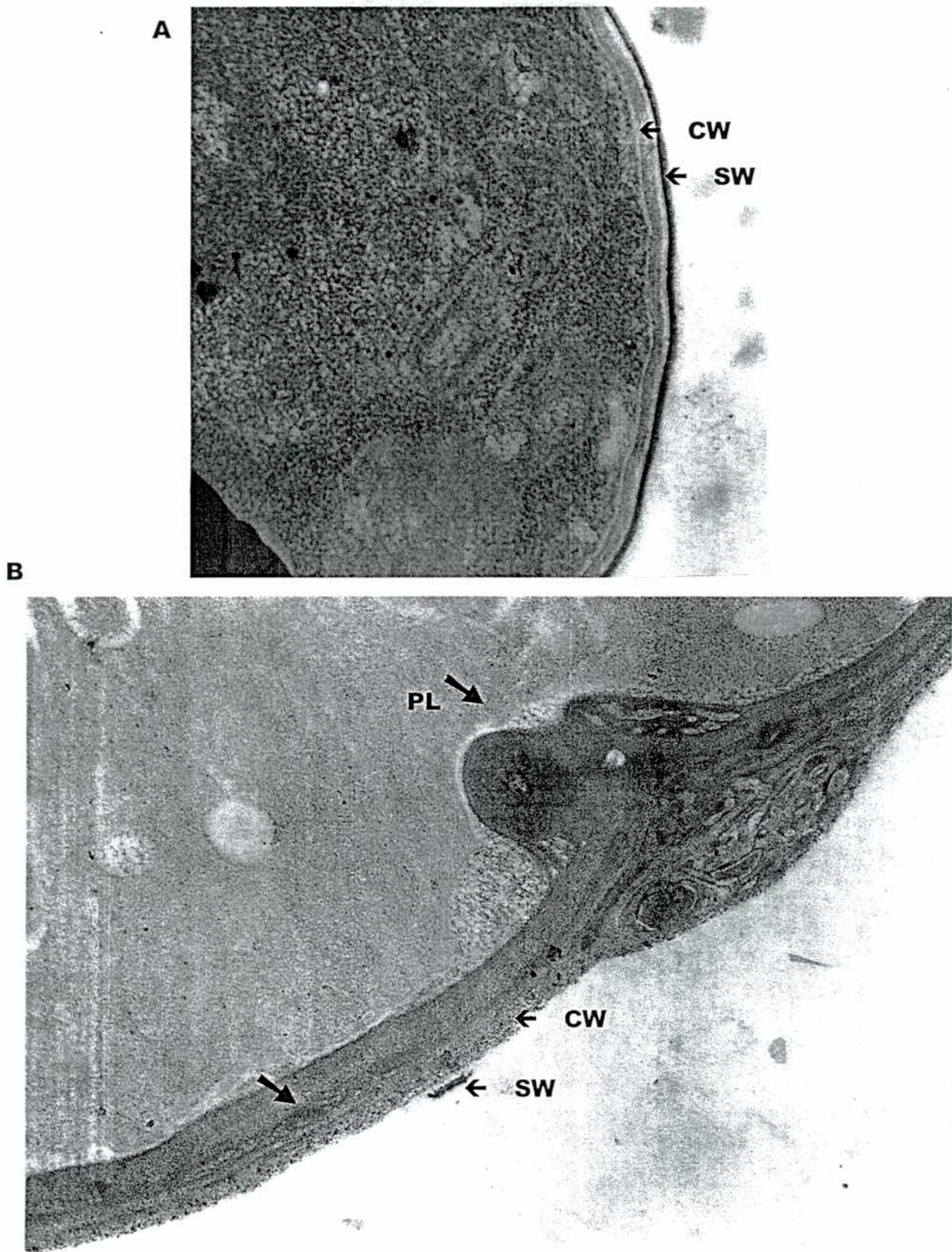


Figura 20- Ultraestructura de la pared celular en células enteras. A- Control 7 hs de cultivo. B- dbcAMP 150 μ M, 12 hs de cultivo. SW: pared de la espora, PL: Plasmalemasoma, CW: pared celular **Aumento:** A: 1cm= 0,3 μ m; B: 1cm= 0,4 μ m

Se realizaron determinaciones morfométricas que han sido volcadas a la Tabla 12. Realizando los cocientes correspondientes entre células control y tratadas con el análogo puede observarse que el volumen celular ha aumentado 14 veces, en las células tratadas, con respecto a las células controles, mientras que el volumen ocupado por la pared ha aumentado 72 veces, o sea que la relación existente entre el volumen ocupado por la pared celular en el volumen total de la célula se encuentra incrementado 5 veces en las células crecidas con dbcAMP, lo que indica que, a pesar de que la célula no puede emitir el tubo germinativo, no se encuentra bloqueada la síntesis de nueva pared celular.

Con el objeto de corroborar que estas estructuras correspondieran efectivamente a la pared celular y no provinieran de artificios introducidos por las técnicas de fijación se prepararon paredes aisladas de células control (7 horas de cultivo) y de células tratadas (12 horas de cultivo). La Figura 21 muestra paredes control (Fig.21A) y tratadas (Fig.21B); en la Fig.21C puede observarse una ampliación de una de las estructuras observadas en B. Las paredes aisladas exhiben las mismas características que se observan en las células enteras. Las paredes provenientes de células control son más finas y el material parece disperso; en los preparados que conservaron la pared de la espora además de la pared vegetativa, la estructura se ve más conservada, pero en ningún preparado observado se ven alteraciones.

Las paredes provenientes de células tratadas con el análogo presentan las mismas estructuras que las células enteras: el espesor es variable, se ven zonas de diferente densidad electrónica y repliegues.

Marchant y Robards (1968) sugieren que los sistemas de membranas asociados con la pared celular deben llevar el nombre general de cuerpos paramurales, reservándose el nombre de plasmalemasomas cuando estos sistemas derivan completamente de la membrana plasmática. En este caso, como puede observarse en las fotografías las estructuras derivan de la membrana plasmática.

La estructura interna de estos plasmalemasomas es variable, pueden verse repliegues irregulares o concéntricos y en los preparados de células enteras cuerpos densos dentro de los cuerpos paramurales provenientes del citoplasma (ver Figura 20 flechas). También se ven zonas más densas en los sectores de la pared que no presentan estos cuerpos (ver Figura 20B flechas).

Tabla 12 - Ultraestructura de la pared de células cultivadas \pm dbcAMP. Análisis morfométrico

Parámetro	Control	dbcAMP
diámetro de esporas (μm)	$7,9 \pm 0,1$	$19,2 \pm 0,1$
espesor pared celular (μm)	$0,06 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,05$
volumen de esporas (μm^3)	258 ± 8	3705 ± 11
volumen pared celular (μm^3)	$1,13 \times 10^{-4}$	$8,18 \times 10^{-3}$

Las esporas fueron inoculadas a 1×10^6 /ml en DMG y cultivadas 7 hs los controles y 12 hs las adicionadas con $150 \mu\text{m}$ dbcAMP. Las células fueron procesadas como se describe en Materiales y métodos. Las mediciones se realizaron sobre 10 células para cada tratamiento. Los volúmenes se calcularon a partir de los diámetros celulares.

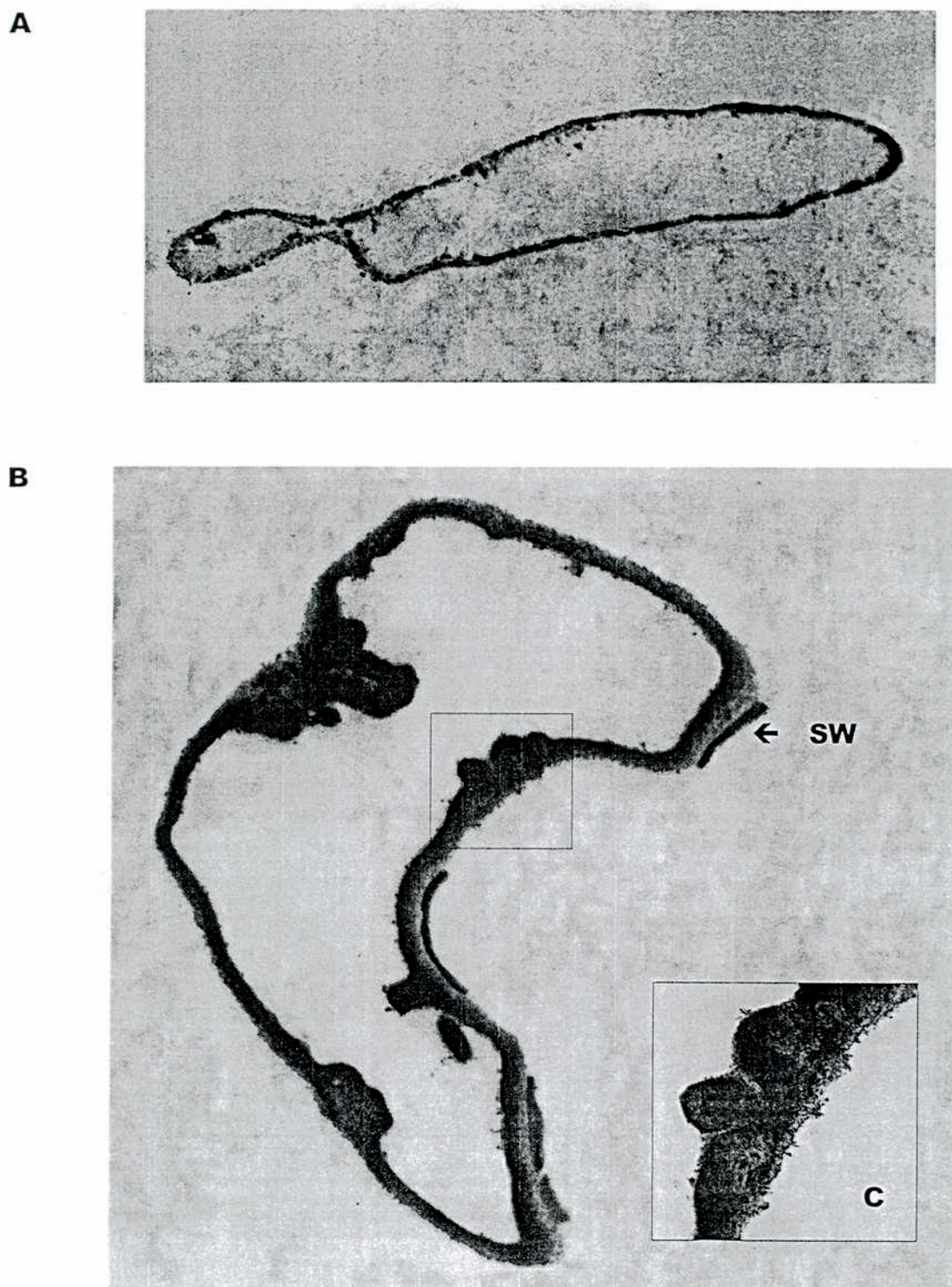


Figura 21- Ultraestructura de la pared celular en preparaciones de paredes aisladas. A- Control 7 hs. B-150 μM dbcAMP, 12 hs de cultivo. C- Detalle de la pared celular de 150 μM dbcAMP. Aumento: A y B 1cm= 1 μm ; C: 1cm= 0,3 μm . SW: pared de la espora.

Existe mucha discusión en la literatura acerca de la configuración real de las estructuras observadas porque en algunos sistemas varía según la técnica de fijación aplicada. En nuestro caso se observan con todas las técnicas utilizadas y siempre la composición es variable e irregular.

Con las evidencias presentadas queda descartada la posibilidad de que la fragilidad celular se debiera a una pared celular debilitada, por ejemplo porque la síntesis se viera impedida, o la lisis aumentada. El déficit no es cuantitativo, podría ser cualitativo. Aquí el enfoque contempla varias posibilidades:

1) Una síntesis diferencial de los componentes de pared que condujera a problemas estructurales porque la variación en la composición alterara sus propiedades mecánicas.

2) Alguna alteración en el sistema lítico de la pared celular, dado que la construcción de la misma se da por un delicado equilibrio entre la síntesis y la lisis (Bartnicki-García et al., 1972).

3) Alteraciones en el ensamblado de los polímeros estructurales, ya que existe abundante información que avala la idea de que la regulación espacial y temporal de la síntesis de los polímeros y su ensamblado es crítica para determinar la funcionalidad de las paredes. (Sentandreu et al., 1994).

EFFECTO DE LOS ANALOGOS DE cAMP SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE MANOPROTEÍNAS EN LA PARED DE *MUCOR ROUXII*

Con el objeto de estimar si existían diferencias en la distribución de las manoproteínas de la pared celular se incubaron células provenientes de cultivos en medio DMG inoculado a 10^5 esp/ml con FITC- concanavalina A, una lectina que se une a los residuos manosa de las glicoproteínas. Las células control provenían de cultivos de 7 hs, mientras que las células tratadas con 300 μ M de dbcAMP fueron incubadas 30 hs.

En la Fig.22 pueden observarse los resultados obtenidos, las células control (Fig. 22A) están homogéneamente teñidas en la célula madre, mientras que en los tubos germinativos, donde la pared es más joven, no se ve fluorescencia (comparar con Fig. 22B correspondiente al contraste de fase) En las células tratadas con el análogo (Fig. 22C) la fluorescencia está incrementada y la distribución no es homogénea sino que aparece particulada sobre la superficie de la pared; la Fig 22D corresponde al contraste de fase.

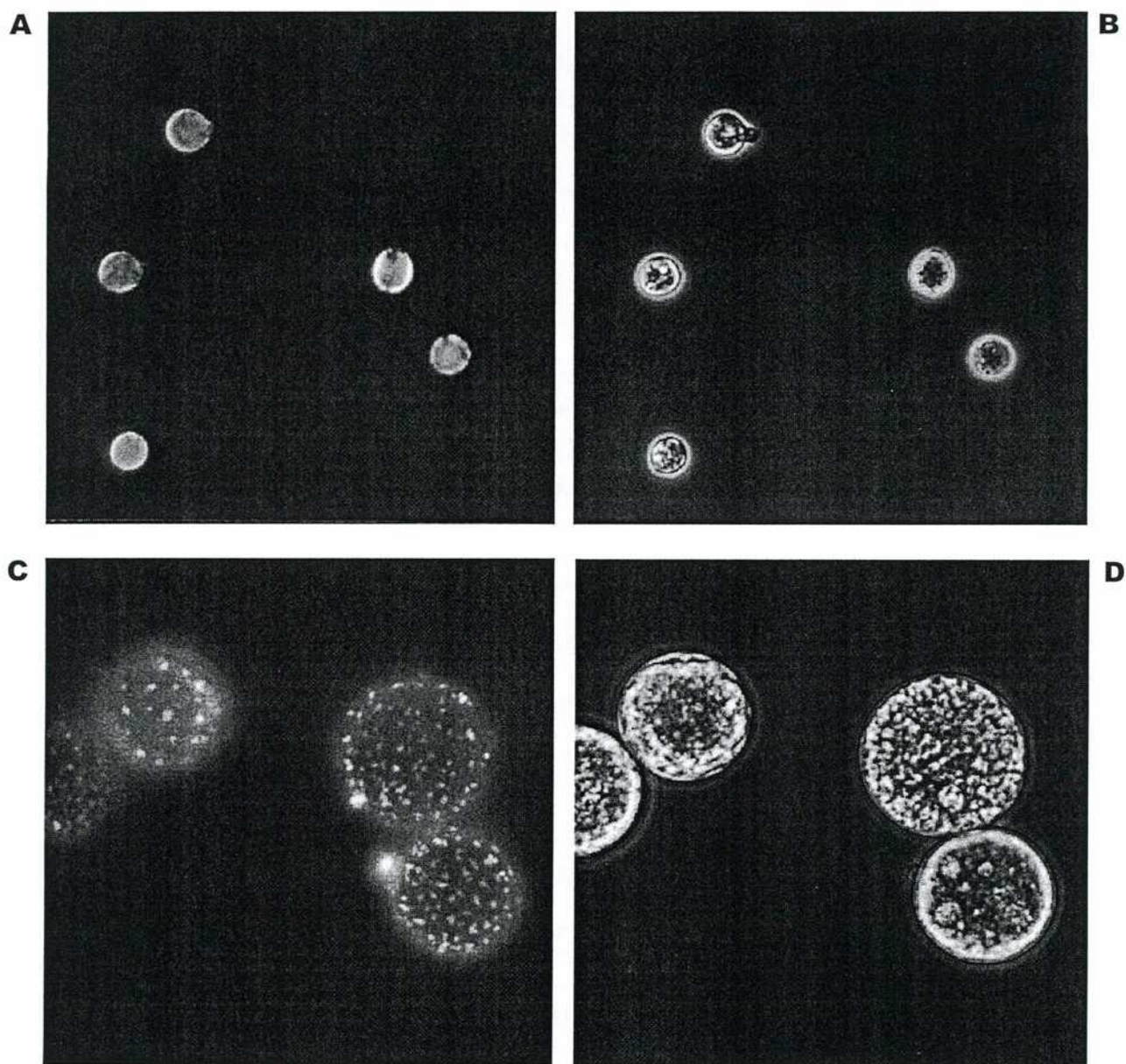


Figura 22- Microscopía de fluorescencia. Tinción con FITC-Concanavalina A (A y C). A- Control 7 hs de cultivo. C- dbcAMP 300 μM, 10⁵ esporas/ml, 30 hs de cultivo. Contraste de fase (B y D) B- Control. D- dbcAMP. Aumento: 1cm=28μm.

DISCUSION

Los resultados obtenidos con citocalasina A sugieren que el efecto producido por los análogos de cAMP involucra al citoesqueleto de actina; dado que es posible reproducir todos los efectos morfológicos producidos por estos compuestos con el agregado de un agente despolimerizante de microfilamentos.

Una observación adicional que avala estos argumentos es el hecho de que la fragilidad celular que presentan las esporas cultivadas en presencia de análogos de cAMP no puede ser prevenida por el agregado de estabilizantes osmóticos al medio de cultivo.

Los hongos que presentan deficiencias en la pared celular e incluso los protoplastos que carecen de pared porque ésta ha sido digerida con enzimas, pueden superar la deficiencia en la regulación de la presión osmótica agregando sustancias que actúan en el medio de cultivo como estabilizantes osmóticos.

En contraste, cepas de *S. cerevisiae* con mutaciones en el gen de actina muestran una marcada fragilidad celular que no puede ser compensada por el agregado de estabilizantes osmóticos en el medio de cultivo (Novick y Botstein, 1985).

Numerosos autores han puesto énfasis en el rol de los filamentos de actina en la emisión y mantenimiento del tubo germinativo (Heath, 1994).

Bartnicki-García postula en su modelo matemático para la generación de la hifa que los microfilamentos podrían regular la posición y movimiento del centro suministrador de vesículas (VSC), elemento indispensable para el normal desarrollo de la pared celular; una desorganización del citoesqueleto podría impedir la llegada o la correcta localización de las vesículas que contienen los precursores de la pared celular (Bartnicki-García, 1990).

La tinción con FITC-faloidina revela que en las células cultivadas con dbcAMP no se observan acúmulos de actina y si bien la fluorescencia no ha sido cuantificada los resultados sugieren que la polimerización de actina puede estar disminuida.

El estudio de la ultraestructura de la pared de las células tratadas con dbcAMP por períodos variables de tiempo revela que está engrosada; el aumento de volumen de la pared a medida que aumenta el tiempo de cultivo también indica que hubo síntesis activa, lo cual correlaciona positivamente con las observaciones de que el análogo no interfiere con el crecimiento celular.

El espesor de la pared es irregular, sugiriendo que la deposición de los componentes de la pared no fue uniforme, esto parece indicar que los mecanismos celulares encargados del transporte de las vesículas que contienen las enzimas de síntesis de la pared y los precursores de los polímeros estructurales y de matriz fueron alterados. Una observación que avala esta hipótesis es la distribución y / o concentración alterada de manoproteínas que se observa en las células tratadas con el análogo de cAMP.

Una alteración del citoesqueleto de actina podría ser compatible con estos resultados ya que podría alterar la correcta distribución del material sintetizado y la llegada de las enzimas líticas y de síntesis a la pared.

En tal sentido es interesante analizar los resultados obtenidos por El Moughith *et al.*, (1984) en esporas de *M. mucedo* en proceso de germinación, tratadas con citocalasina A; ellos observan que el tratamiento prolongado con este compuesto produce alteraciones en la pared celular similares a las que se observan en células de *M. rouxii* tratadas con análogos de cAMP.

En la Fig.23 A,B,C tomada del trabajo antes citado pueden observarse los plasmalemasomas con su estructura irregular, los componentes electrónicamente densos y el engrosamiento del espacio periplásmico que acompaña a estas formaciones. También señalan la aparición de vesículas conteniendo material muy denso, las cuales no se observan en condiciones fisiológicas.

La Fig.23D corresponde a una espora de *M. rouxii* cultivada en un medio con dbcAMP durante 15 horas ; nótese la similitud en las estructuras, así como la aparición de las vesículas conteniendo material muy denso.

Los resultados presentados tomados en conjunto sugieren que el tratamiento con análogos de cAMP produce alteraciones en el citoesqueleto de actina, tal como ha sido propuesto en una amplia gama de tipos celulares en eucariontes superiores.

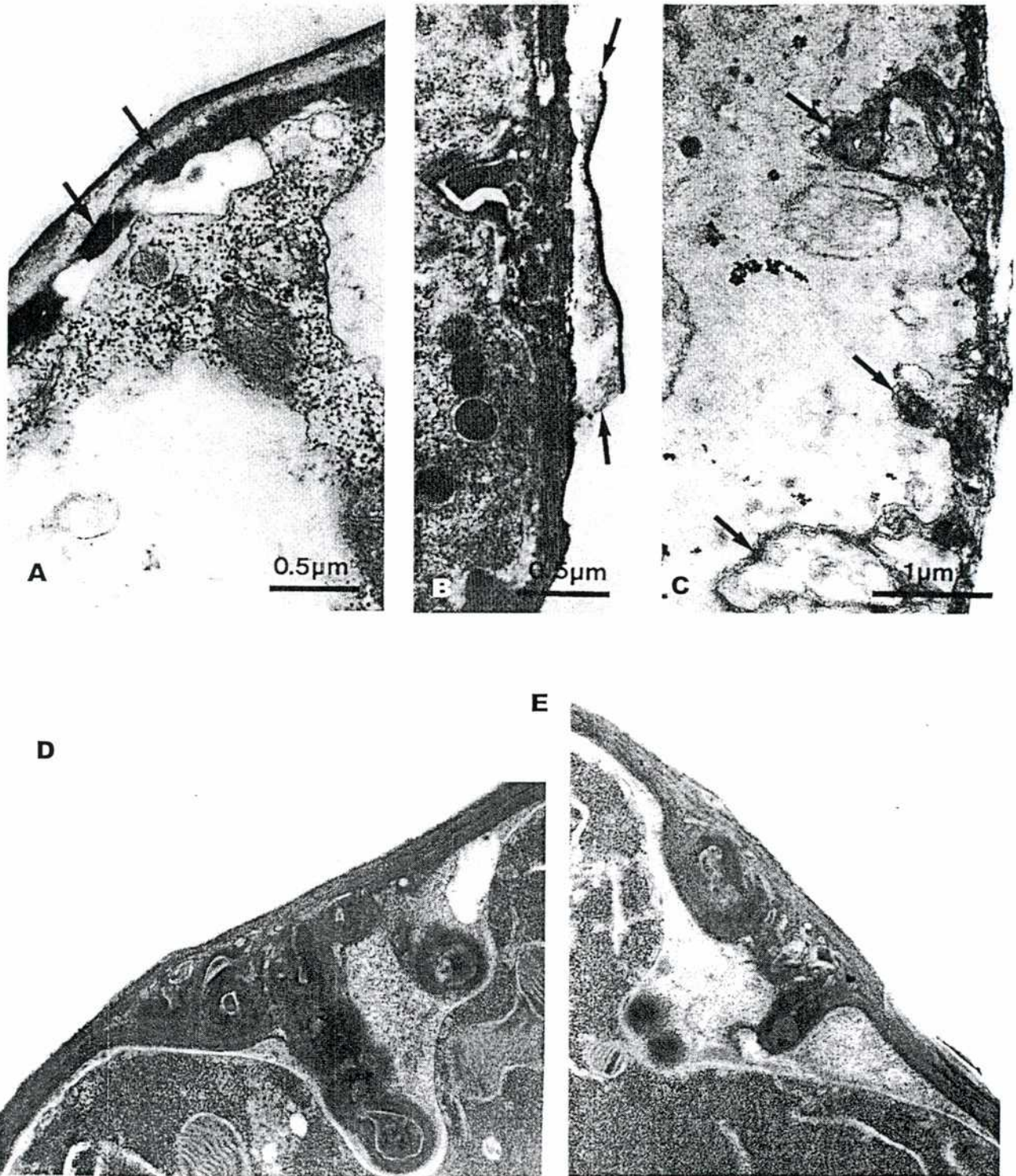


Figura 23- A, B y C- Ultraestructura de la pared celular de *Mucor mucedo*, en células tratadas con citocalasina A (El Mougith, 1984). D y E- Ultraestructura de la pared celular de *Mucor rouxii*, en células tratadas con 150 μM dbcAMP durante 15 hs.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Hemos estudiado, detalladamente, el efecto producido por el agregado de análogos de cAMP, a esporas de *M.rouxii* en germinación aeróbica, durante la emisión del tubo germinativo.

El efecto observado fue la inhibición del crecimiento polarizado, las células mantienen el crecimiento isodiamétrico característico de las primeras etapas de la germinación, alcanzando volúmenes muy superiores a los que se observan en esporas en germinación aeróbica.

La inhibición de la polarización parece suceder sin que se afecte el crecimiento general de las células, ya que parámetros tales como el peso seco, el contenido de proteínas, el contenido de DNA y el número de núcleos son similares durante las primeras doce horas de cultivo, con inóculos de 10^6 esp./ml.

El efecto es dosis dependiente, la concentración necesaria para inhibir completamente la emisión del tubo germinativo es inversamente proporcional a la densidad celular.

El crecimiento isodiamétrico puede lograrse antes o después de la germinación y es reversible.

Otras características de estas células son la pigmentación incrementada, la falta de adhesividad celular y la fragilidad celular que no puede ser compensada con el agregado de estabilizantes osmóticos al medio de cultivo.

Los análogos capaces de producir el efecto son aquellos específicos para el sitio 2 de la PKA y el dbcAMP, cuya estructura fue diseñada para conferirle lipofilicidad a la molécula de nucleótido cíclico.

Esta selectividad podría explicarse, para los análogos específicos de sitio, teniendo en cuenta su potencia como activadores de la PKA en sistemas *in vitro*, dado que otros parámetros como la lipofilicidad y el IC_{50} para la hidrólisis del [3H]cAMP por la PDE de alta afinidad para cAMP son similares.

Se observa que cuanto mayor es la concentración de enzima a ser activada mayor es la concentración de análogo necesaria para activarla y mejor se evidencia la diferencia entre los análogos de sitio 1 y 2.

En el caso del dbcAMP su potencia podría explicarse teniendo en cuenta el IC_{50} obtenido en la competencia con el [3H]cAMP por la hidrólisis ejercida por la PDE, ya que

es superior en dos órdenes a la de los demás compuestos y no por su potencia como activador dado que su $A_{0,5}$ para la activación de la PKA es superior a la de todos los compuestos ensayados. Otro resultado que avala esta hipótesis es que cAMP endógeno está aumentado 10 veces con respecto a los controles, en las células cultivadas con dbcAMP.

El mejor inhibidor, *in vitro*, de la PDE de alta afinidad de *M.rouxii* es capaz de producir, *in vivo*, la inhibición de la polarización, con las mismas características que los análogos de cAMP, lo que refuerza la idea de que éste es un efecto mediado por la PKA.

Analizando el efecto desde el punto de vista de las condiciones nutricionales y ambientales puede observarse que la inhibición del crecimiento polarizado puede obtenerse en cualquier situación estudiada ya sea con análogos de cAMP y/o inhibidores de la PDE, lo que sugiere que es un efecto general mediado por la PKA.

La observación de los tiempos de emisión del tubo germinativo y los volúmenes alcanzados por las células en ese momento en función de la riqueza del medio de incubación, así como las actividades específicas de la PKA durante la emisión del tubo germinativo, para los diferentes medios de incubación, sugiere que la actividad de PKA correlaciona con la diferenciación y no con el crecimiento y se postula la necesidad de una concentración "crítica" de PKA que debe alcanzar la célula para germinar.

El estudio de las actividades específicas de las células cultivadas con análogos de PKA o inhibidores de PDE en todas las situaciones experimentales anteriormente descritas muestra que la actividad específica de C se encuentra reducida, o que la actividad específica de R se encuentra aumentada con respecto al control; lo que conduce a cocientes R/C aumentados. La falta de inhibidores específicos para la PKA de *Mucor rouxii* que aseguren la ausencia de actividad enzimática no permite discernir si los efectos morfológicos observados son el resultado de una estimulación sostenida o una disminución regulada de la PKA.

El agregado de citocalasina A a cultivos de *M.rouxii* en diferentes etapas de la germinación produce alteraciones morfológicas similares a las que se observan por el agregado de análogos de cAMP, en ambas situaciones se promueve el crecimiento isodiamétrico, se puede obtener el efecto antes o después de la emisión del tubo germinativo y es reversible. Estos resultados sugieren que los efectos mediados por PKA pueden involucrar a la filamentación de actina.

El análisis de la ultraestructura de la pared revela que la misma está engrosada, presenta irregularidades en el espesor y en la deposición de los componentes, lo cual sugiere que la síntesis no parece haberse inhibido en general sino que la localización y quizás el ensamblado de los componentes parece haberse alterado tal como se evidencia por la distribución alterada de manoproteínas en la pared celular de las células incubadas con dbcAMP.

Realizando un análisis comparativo entre las estructuras que se observan por efecto de la incubación con análogos de cAMP en *M.rouxii* y de las estructuras que se obtienen por tratamiento con citocalasina A en *M.mucedo* surgen similitudes tanto en las morfologías observadas como en la aparición de grandes vesículas conteniendo material denso. Estas observaciones nuevamente sugieren que los microfilamentos parecen estar alterados en las células tratadas con análogos de cAMP.

Estos resultados sumados a la ausencia de estructuras que sugieran la existencia de actina polimerizada, la fragilidad celular que no puede ser compensada con estabilizantes osmóticos (característico de los hongos que presentan mutaciones en el gen de actina) y la falta de adhesividad celular sugieren fuertemente que el citoesqueleto de actina está involucrado en los efectos mediados por PKA, tal como se ha observado en eucariontes superiores.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

La organización del citoesqueleto de actina y la polaridad celular está gobernada en células de mamíferos por la familia de las proteínas Rho, un amplio grupo de proteínas de bajo peso molecular que unen GTP, las cuales a su vez forman parte de la superfamilia de las proteínas Ras (Machesky y Hall, 1996; Ridley, 1996). La Fig.1 muestra la acción de Rho A activada sobre la polimerización de actina, en eucariontes superiores.

La mayor parte del conocimiento sobre las funciones de Rho se obtuvo por el uso de la exoenzima C₃ de *Clostridium botulinum*, una ADP-ribosil transferasa que modifica covalentemente a Rho en su dominio efector. Las observaciones de Chardin en 1989 demostraron que la inactivación de Rho en células Vero inducía la despolimerización del citoesqueleto de actina.

Las proteínas Rho también están involucradas en el control de algunas funciones especializadas en células diferenciadas, como la mediación en la agregación plaquetaria (Morii *et al.*, 1992;) y la citotoxicidad de los linfocitos T y células NK (Lang *et al.*, 1992).

La observación de que los análogos de cAMP producían cambios en la morfología celular y la motilidad similares a los que se obtenían con C₃ transferasa llevaron a postular a las proteínas Rho como potenciales sustratos de fosforilación por PKA. La comparación de secuencias de aminoácidos mostró que RhoA posee un sitio consenso para la fosforilación por PKA. Ensayos *in vitro* e *in vivo*, en linfocitos T, permitieron demostrar que la fosforilación de RhoA por PKA inducía la traslocación de RhoA de la membrana plasmática al citoplasma impidiendo su función sobre el citoesqueleto (Lang *et al.*, 1996). En la Fig.2 puede observarse el esquema propuesto para la inactivación de Rho A mediada por PKA en eucariontes superiores.

En células mesangiales también se ha propuesto a Rho como mediadora de los efectos producidos por cAMP y otros agentes que elevan los niveles del nucleótido cíclico (Kreisberg, *et al.*, 1997).

En leucocitos la polarización celular y la migración se encuentran asociadas con la actividad de PKA y de Rho. La activación de la PKA y la inactivación de Rho inducen la polarización de los linfocitos y el reclutamiento de proteínas de adhesión en el uropodio del linfocito (Sánchez-Madrid y del Pozo, 1999).

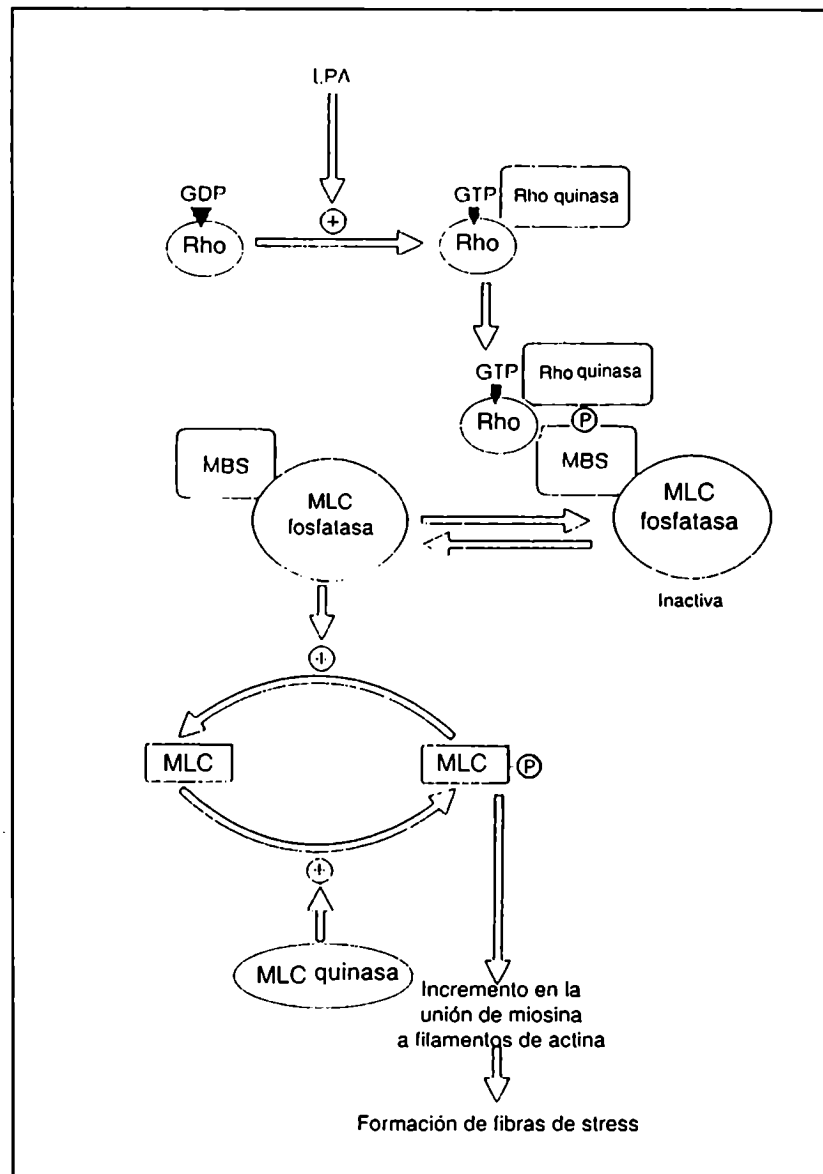


Figura 2- Formación de las fibras de stress de microfilamentos de actina inducidas por RhoA. Factores extracelulares (LPA) estimulan el incremento de Rho-GTP. Esta interactúa con Rho-quinasa y con la subunidad que se une a miosina (MBS) de la fosfatasa de la cadena liviana de la miosina (MLC-fosfatasa). Rho-GTP activa a Rho-quinasa la cual fosforila a MBS produciendo la inactivación de la fosfatasa. Se acumula entonces MLC fosforilada aumentando la unión de miosina a los filamentos de actina lo que induce la formación de las fibras de stress. No se sabe si Rho puede interactuar simultáneamente con Rho-quinasa y MBS.

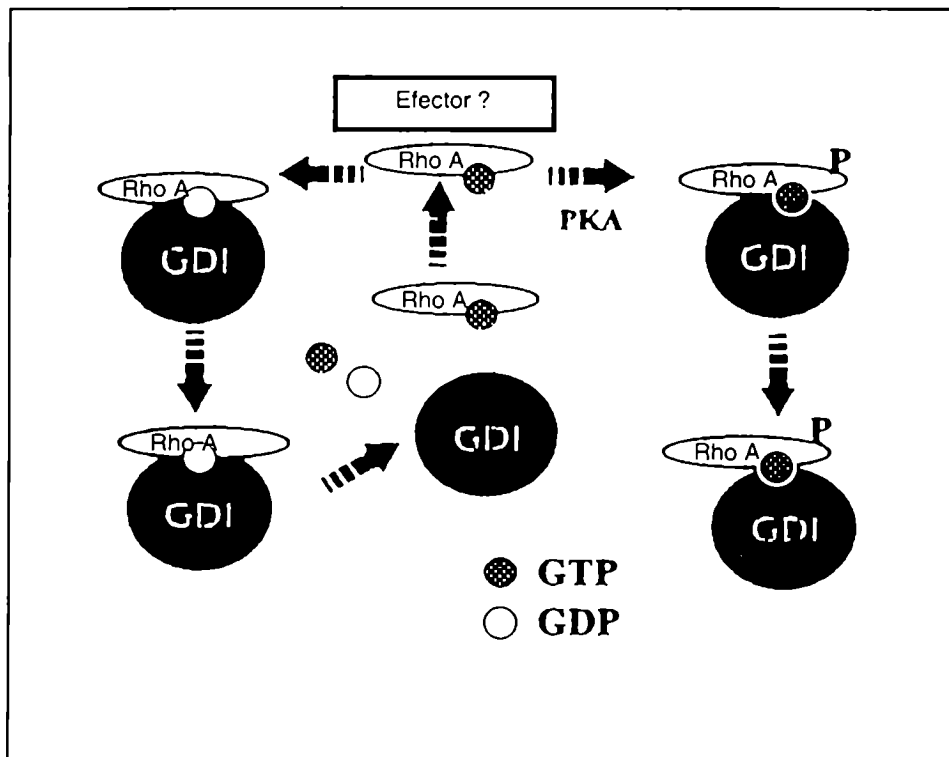


Figura 1- Regulación de la actividad de RhoA. RhoA en su forma unida a GTP interactúa con una molécula efectora asociada a membrana, la señalización procede con hidrólisis de GTP; la forma inactiva RhoA-GDP es conducida hacia el citosol por GDI, donde luego de la disociación del GDI y del intercambio por GTP comienza un nuevo ciclo. Alternativamente, RhoA-GTP es fosforilada por PKA y extraída de la membrana plasmática por GDI terminando el ciclo de señalización prematuramente. El destino de RhoA-GTP fosforilada no ha sido establecido.

Similares observaciones en otros sistemas con otros miembros de la familia Rho tales como Rap1A en neutrófilos y Rap1B en plaquetas condujeron a postularlos como sustratos para fosforilación mediada por PKA (Kawata *et al.*, 1989; Lapetina *et al.*, 1989; Quilliam *et al.*, 1991).

Se ha postulado a Rho como intermediaria de otros efectos desencadenados por cAMP en melanocitos, además de la diferenciación a astrocitos y la desorganización del citoesqueleto de actina producido por su inhibición. La síntesis de melanina está regulada positivamente por cAMP y la expresión de una Rho constitutivamente activada impide el efecto activador del cAMP (Busca *et al.*, 1998).

En *S. cerevisiae* la formación de gemas comienza una vez que se ha seleccionado en la superficie de la célula madre un sitio para la formación de la célula hija, a través de un elaborado y jerarquizado mecanismo bioquímico (Chant y Stowers, 1996). Una vez elegido el sitio se establece la polaridad celular, la gema comienza a emerger y crecer; luego de la citoquinesis, la gema se convierte en una célula hija independiente. La forma de la célula de la levadura se establece durante la construcción de la pared celular por la deposición de glucano, el cual es el principal componente de la pared celular de *Saccharomyces*. La formación de la gema comienza por la punta y es necesario que los componentes que la formarán sean guiados a este sitio para asegurar la correcta formación. El citoesqueleto de actina polariza el aparato secretorio hacia la punta de la gema para proveer los materiales de construcción.

Se ha observado que la proteína Rho1 prenilada colocaliza con la actina cortical en la superficie interna de la membrana plasmática, tanto en el sitio de crecimiento de la gema, como en la zona de separación madre-hija durante la citoquinesis (Yamochi *et al.*, 1994). El gen que codifica para Rho1 es esencial, si es interrumpido la célula cesa de crecer cuando las gemas son muy pequeñas y las paredes celulares estallan en la punta de las gemas (Nonaka *et al.*, 1995; Paravicini *et al.*, 1995). Rho1 tiene 72% de identidad con RhoA de eucariontes superiores y ésta es capaz de sustituir parcialmente a Rho1 en levaduras (Qadota *et al.*, 1994).

Recientemente dos grupos de investigación no relacionados han reportado simultáneamente que Rho1 es la subunidad activadora de la glucano sintetasa y proponen que Rho1 regula la síntesis de glucano y asegura que la pared celular se sintetice en la punta de las gemas y en las zonas de remodelado a través de su doble

función como integrante de la glucano sintetasa y su acción sobre el citoesqueleto de actina (Drgonová *et al.*, 1996; Qadota *et al.*, 1996).

Existen en levaduras varias proteínas de la familia Rho y todas están relacionadas con el mantenimiento de la polaridad celular, pero Rho 1 es la única que se ADP-ribosila por la exoenzima C₃ de *C. botulinum* (Qadota *et al.*, 1994; McCaffrey *et al.*, 1991).

Hemos comprobado analizando las secuencias de las Rho de levaduras que Rho1 es también la única que posee un sitio consenso para la fosforilación por PKA, similar al descrito para RhoA en eucariontes superiores.

Nuestro objetivo está enfocado ahora en realizar experimentos con la exoenzima C₃ para observar las morfologías adoptadas por las células, incubarr células con exoenzima C₃ y marcarlas radiactivamente, analizando las bandas por autorradiografía y realizar ensayos de western blot con anticuerpos anti-Rho para tratar de investigar si existe Rho1 en nuestro sistema. De ser así los siguientes pasos serían tratar de dilucidar si los efectos morfológicos reportados en esta tesis, mediados por la vía de transducción de señales de la PKA, involucran a una proteína Rho en *M. rouxii*, tal como sucede en eucariontes superiores.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Adams, A.E.M.; Botstein, D. y Drubin, D.G. (1991), *Nature* 354: 404-408.
- Adams, J.A. y Taylor, S.S (1993), *J. Biol. Chem.* 268: 7747 - 7752.
- Adelstein, R.S., Conti, M.A., Hathaway, D.A. y Klee C.B. (1978), *J. Biol. Chem.* 253: 8347-8350.
- Alhanaty, E. y Shaltiel, S., (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 323 - 332.
- Allen, E.D., Aiuto, R. y Sussman, S. (1980), *Protoplasma* 102: 63-75.
- Appleman, M.M., Thompson, W.J. y Russell, T.R. (1973), *Adv. Cyc. Nucl. Res.* 3: 65 - 98.
- Barber, R. y Butcher, R.W. (1983), *Adv. Cyc. Nucl. Res.* 15: 119-138.
- Barrera, C.R. (1983), *J. Bacteriol.* 155: 886-895.
- Bartnicki-García, S. (1963), *Bacteriol. Rev.* 27: 293-304.
- Bartnicki-García, S. (1981). En: *Microbiology. American Society for Microbiology.* D. Schlessinger (Ed.). Washington.
- Bartnicki-García, S. y Nickerson, W.J. (1962a), *J. Bacteriol.* 84: 820-840.
- Bartnicki-García, S. y Nickerson, W.J. (1962b), *J. Bacteriol.* 84: 841-858.
- Bartnicki-García, S. (1990). En: *Tip Growth In Plant And Fungal Cells.* I. B. Heath (Ed.). San Diego Academic Press.
- Bartnicki-García, S. y Bracker, C.E. (1984). En: *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis.* C. Nombela (Ed.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Bartnicki-García, S. y Lippman, E. (1972), *J. Gen. Microbiol.* 73: 487-500.
- Bartnicki-García, S. (1968), *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-108.
- Bartnicki-García, S. (1996). En: *A Century of Mycology.* B. Sutton (Ed.). Cambridge University Press.
- Bartnicki-García, S., Nelson, N. y Cota-Robles, E. (1968a), *Arch. Microbiol.* 63: 242-255.
- Bartnicki-García, S., Nelson, N. y Cota-Robles, E. (1968b), *J. Bacteriol.* 95: 2399- 2402.
- Beavo, J.A., Bechtel, P.J. y Krebs, E.G. (1974), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 3580-3583.
- Beavo, J.A., Hansen, R.S., Harrison, S.A., Hurwitz, R.L., Martins, T.I. y Mumby, M.D. (1982), *Mol. Cel. Endocrinol.* 28: 387 - 410.
- Beavo, J.A. (1995), *Physiol. Rev.* 75: 725-748.
- Beebe, S., Holloway, R., Rannels, S.R., Corbin, J.D. (1984), *J. Biol. Chem.* 259: 3539-3547.

- Beebe, S., Segaloff, D., Burks, D., Beasley-Leach, A., Limbird, L.E., Corbin, J.D. (1989), *Biol. Reproduc.* 41: 295-307.
- Beebe, S. y Corbin, J.D.(1986). En: *The Enzymes: Control by phosphorylation*, Part A, Vol: 77; eds. New York, Academic 1.
- Bencina, M., Panneman, H., Ruijter, G.J., Legisa, M., y Visser, J. (1997), *Microbiol.* 143: 1211-1220.
- Bertics, P.J. y Gill, G.N., (1985), *J. Biol. Cell*, 260: 14642.
- Betina, W., Micekowa, D., Nemeč, P. (1972), *J. Gen. Microbiol.* 71: 343-349.
- Beullens, M., Mbobyi, K. y Geerts, L. (1988), *Eur. J. Biochem.* 172: 227-231.
- Bianchini, G., Pastini, A., Muschiatti, J., Téllez-Iñón, M.T., Torres, H. y Flawiá, M. (1990), *Biochim. Biophys. Acta* 1055: 75 - 81.
- Botsford, J.L., (1981), *Microbiol. Rev.* 45: 620-642.
- Bourret, J.A. y Smith, C.M. (1987), *Exp. Mycol.* 10: 60-66.
- Boynton, A.L., y Whitfield, J.K. (1983), *Adv. Cyc. Nucl. Res.* 15: 193-294.
- Bradford, M. (1976), *Anal. Biochem.* 72: 248- 254.
- Braunmann, T., Jastorff, B. (1985), *J. Chromat.* 350: 105-118.
- Bregman, D.B., Battacharya, N. y Rubin, C.S. (1989), *J. Biol. Chem.* 264: 8183-8189.
- Bruno, K.S., Aramayo, R., Minke, P.F., Metzenberg, R.L. y Plamann, M. (1996), *EMBO J.* 15: 5772-5782.
- Brunton, A.H. y Gadd, G.M. (1989), *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 49-54.
- Buechler, J.A. y Taylor, S.S. (1988), *Biochem.* 27: 7356-7361.
- Buechler, J.A. y Taylor, S.S. (1990), *Biochem.* 29: 1937-1943.
- Burk, R.R. (1969), *Nature* 219: 1272.
- Busca, R., Bertolotto, C., Abbe, P., Englaro, W., Ishizaki, T., Narumiya, S., Boquet, P., Ortonne, J.P. y Ballotti, R. (1998), *Moll. Biol. Cell* 9: 1367-1378.
- Butt, Z., Hoch, H., Staples, R. y St. Leger, R. (1989), *Exp. Mycol.* 13: 303-320.
- Cano, A., Herrera-Estrella, L. y Ruiz-Herrera, J. (1988), *J. Bacteriol.* 170: 5946-5948.
- Cano, A. y Ruiz Herrera, J. (1988), *Exp. Mycol.* 12: 47-49.
- Cantore, M.L., Galvagno, M.A. y Passeron S.(1983). *C.B. Int. Rep.* Vol.7, 11: 947-954.
- Cantore, M.L.; Galvagno, M.A. y Passeron, S., (1980), *Arch. Biochem. Biophys.* 199: 312 - 320.
- Carr, D.W., Stofko-Hahn, R.E., Fraser, I.D.C., Bishop, S.M., Acott, T.S., Brennan, R.G. y Scott, J.D. (1991), *J. Biol. Chem.* 266: 14188 - 14192.
- Carricarte, V., Bianchini, G., Muschiatti, J., Téllez Iñón, T., Rubinstein, C. y Torres, H. (1988), *Biochem. J.* 249: 807 - 811.
- Castilla, R., Passeron, S. y Cantore, M.L. (1996). *VIII PABMB Congress*. Pucón. Chile.

- Castilla, R.**, Passeron, S. y Cantore, M.L. (1998), *Cell. Signal.* 10 : 713.
- Cattolico, R.** y Gibbs, S. (1975), *Anal. Biochem.* 69: 572-582.
- Chant, J.** y Stowers, L. (1995), *Cell* 81: 1-4.
- Chardin, P.**, Boquet, P., Madaule, P., Popoff, M.R. y Gild, D.M. (1989), *EMBO J.* 8: 12863-12869.
- Chijiwa, T.**, Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Clegg, C.H., Codd, G.G. y McKnight, G.S., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3703-3707.
- Coghlan, V.M.**, Bergeson, S.E., Langerber, L., Nilaver, G. y Scott, J.D. (1993), *Mol. Cell. Biochem.* 128: 309 - 319.
- Colombo, S.**, Ma, P., Cauwenberg, L., Winderickx, J., Crauwels, M., Teunissen, A., Nauwelaers, D., de Winde, J.H., Gorwa, M.F., Colavizza, D. y Thevelein, J.M. (1998), *EMBO J.* 17: 3326-3341.
- Cohen, S.** (1992), *Trends Biochem. Sci.* 17: 408-413.
- Cooper, J.A.** (1987), *J. Cell Biol.* 105: 1473-1478.
- Cooper, L.A.**, Edwards, S.W. y Gadd, G.M. (1985), *J. Gen. Microbiol.* 131: 1589-1593.
- Corbin, J.D.**, Keely, S.L. y Park, C.R. (1975), *J. Biol. Chem.* 250: 218-225.
- Coso, O.** (1993), *Tesis Doctoral.* FCEN. UBA
- Dandekar, S.**, Modi, V.V. (1980), *Biochim. Biophys. Acta* 628: 398-406.
- Dewerchin, M.A.** y Van Laere, A.J. (1984), *J. Bacteriol.* 158: 575-579.
- Domek, D.B.** y Borgia P.T. (1981), *J. Bacteriol.* 146: 945-951.
- Døskeland, S.O.** y Øgreid, D. (1984), *J. Biol. Chem.* 259: 2291-3201.
- Døskeland, S.O.**, Maronde, E. y Gjertsen, B. (1993), *Biochim. Biophys. Acta* 1178: 249 - 259.
- Dow, J.M.** y Rubery, P.H. (1977), *J. Gen. Microbiol.* 99: 29-41.
- Dow, J.M.**, Carreon, R.R. y Villa, V.D. (1981), *J. Bacteriol.* 145: 272-279.
- Dow, J.M.** y Villa, V.D. (1980), *J. Bacteriol.* 142: 939-944.
- Drgonová, J.**, Drgon, T., Tanaka, K., Kollár, R., Chen, G. C., Ford, R.A., Chan, C.S.M., Takai, Y. y Cabib, E. (1996), *Science* 272: 277-279.
- Durrenberger, F.**, Wong, K. y Kronstad, J.W. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 5684-5689.
- Egan, J.J.**, Gronowicz G. y Rodan, G.A. (1991), *J. Cell. Biochem.* 45: 93-100.
- Egidy, G.**, Paveto, M.C., Passeron, S. y Galvagno, M.A. (1990), *Cell. Biol. Int. Rep.* 14: 59-68.
- Egidy, G.**, Paveto, C., Passeron, S. y Galvagno, M.A. (1990), *Exp. Mycol.* 13: 428-432.

- Ekanger, R., Vintermyr, O.K., Houge, G., Sand, T.E., Scott, J.D., Krebs, E.G., Eikitor, T., Christoffersen, T., Øgreid, D. y Døskeland, S.O. (1990), *Mol. Endocrinol.* 4: 481-488.
- Ekanger, R., Vintermyr, O., Houget, G., Sand, T., Scott, J., Krebs, E. G., Eikhom, T., Christoffersen, T., Ogreid, D., Doskeland, S. (1989), *J. Biol. Chem.* 264: 4374-4382.
- El Mougith, A., Dargent, R., Touze-Soulet, J.M. (1988), *C.R. Acad. Sci. Ser. III* 306: 427-432.
- El Mougith, A. Dargent, R., Touze-Soulet, J.M. y Montant C. (1984), *Biol. Cell.* 52: 181-190.
- Fantozzi, D., Harootunian, A., Wen, W., Taylor S.S., Feramisco, J., Tsien, R. y Mein Kothy, J. (1994), *J. Biol. Chem.* 269: 2676-2686.
- Farkas, V., Sulova, Z. y Lehotsky, J. (1985), *J. Gen. Microbiol.* 131: 317-320.
- Fischer, E.H. y Krebs, E.G., (1955), *J. Biol. Chem.* 216: 121-132.
- Flawiá, M. y Torres, H. (1972a), *J. Biol. Chem.* 217: 6873-6879.
- Flawiá, M. y Torres, H. (1972b), *J. Biol. Chem.* 217: 6880-6883.
- Francis, S.H. y Corbin, J.D. (1994), *Ann. Rev. Physiol.* 56: 237-272.
- Galvagno, M.A., Moreno, S., Cantore, M.L., y Passeron, S. (1979), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 779-785.
- Galvagno, M.A., Forchiassin, F., Cantore, M.L. y Passeron, S. (1984), *Exp. Mycol.* 8: 334-341.
- Gilman, A.G. (1987), *Ann. Rev. Biochem.* 56: 615-649.
- Glass, D.B., Feller, M.J., Levin, L.R. y Walsh, D.A. (1992), *Biochemistry* 31: 1728-1734.
- Glass, W.F., Kreisberg, J.I. (1993), *J. Cell. Physiol.* 157: 296-306.
- Glikin, G., Judewicz, N. y Torres, H.N. (1982), *Mol. Cell. Biochem.* 46: 121.
- Gold, S., Duncan, G., Barret, K. y Kronstad, J. (1994), *Genes & Development* 8: 2805 - 2816.
- Gold, S.E., Brogdon, S.M., Mayorga, M.E. y Kronstad, J.W. (1997), *Plant Cell* 9: 1585-1594.
- Gooday, G.W. (1974), *Annu. Rev. Biochem.* 43: 35-49.
- Govind.N.S., Modi.V.V. (1981), *Indian J. Exp. Biol* 19: 544-546.
- Granot, J., Mildvan, A.S. y Kaiser, E.T. (1980), *Arch. Biochem. Biophys.* 205: 1-17.
- Gross, J.D. (1994), *Microbiol. Rev.* 58: 330-351.
- Gross, R.E., Bagchi, S., lu, X. y Rubin, C.S. (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 6896-6907.
- Gross, R.E., Rubin, C.S., (1990), *J. Biol. Chem.* 260: 6296.
- Grove, S.N. y Sweigard J.A. (1980), *Exp. Mycol.* 4: 239-250.
- Guthmann, M., Pastori, R. y Moreno, S. (1990), *Cell. Signal.* 2: 395 - 402.
- Haarer, B.K., Lillie, S.H. y Adams A.E.M. (1990), *J. Cell Biol.* 110: 105-114.

- Haidle, C.W. y Storck, R. (1966), *J. Bacteriol.* 92: 1236-1244.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. y Hunter, T. (1988), *Science* 241: 42 - 52.
- Hardie, D.G. (1993). En: *Protein Phosphorylation. The Practical Approach Series*. Editor: Rickwood, D. y Hames, B.D. Oxford University Press.
- Harper, J.F., Haddox, M.K., Johanson, R., Hanley, R.M. y Steiner, A.L. (1985), *Vitam. Horm.* 42:197 - 252.
- Hasek, J. y Bartnicki-Garcia, S. (1994), *Arch. Microbiol.* 161: 363-369.
- Hashiba, T. (1982), *Bulletin of the Hokuriku National Agricultural Experimental Station (Japan)* 24: 29-83.
- Hashimoto, E., Takio, K. y Krebs, E.G. (1981), *J. Biol. Chem.* 256: 5604-5607.
- Hayat, M.A. (1986). En: *Basic Techniques for Transmission Electron Microscopy*. Academic Press.
- Heacock, C.S., Eidsvoog, K.E. y Bamberg, J.R. (1984), *Exp. Cell Res.* 153: 402-412.
- Heath, I.B. (1990), *Int. Rev. Cyt.* 123: 95-127.
- Heath, I.B. (1994). En : *The Growing Fungus*. A.R. Gow y G.M. Gadd (Eds.). Chapman & Hall. Londres.
- Heath, I.B. (1987), *Eur. J. Cell Biol.* 44: 10-16.
- Hedin, L., McKnight, G.S., Lifka, J., Durica, J.O. y Richards, J.S. (1989), *Endocrinology* 120: 1928-1935.
- Heidrick, M.L. y Ryan W.L. (1970), *Cancer Res.* 30: 376.
- Hemmings, B. A. (1986), *FEBS Lett.* 196: 126-130.
- Hemmings, B.A., Aitken, A., Cohen, P, Rymond, M. y Hofmann, F. (1982), *Eur. J. Biochem.* 127: 473-481.
- Hidaka, H., Hayashi, H., Kohri, H., Kimura, Y., Hosokawa, T., Igawa, T. y Saitoh, Y. (1979), *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics* 211: 26-30.
- Hoch, H.C. y Staples, R.C. (1984), *Exp. Mycol.* 8:37-46.
- Hoechststrasser, M., Nelson, D.L. (1989), *J. Biol. Chem.* 264: 14510.
- Hoffmann, F., Beavo, J.A., Betchel, P. y Krebs, E.G. (1975), *J. Biol. Chem.* 250: 7795-7801.
- Hohl, N., Galland, P., Senger, H. (1992), *Photochem. Photobiol.* 55: 239-245.
- Hokberger, P E. y Swandulla, D. (1987), *Cell. Molec. Neurobiol.* 7: 229-241.
- Houge, G., Vintermyr, O.K. y Døskeland, S.O. (1990), *Mol. Endocrinol.* 4: 481-488.
- Hsie, A., Kawashima, K., O'Neill, J.P. y Schroder, C. H. (1975), *J. Biol. Chem.* 250: 984-989.
- Hsie, A. W. y Puck, T. T. (1971), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68: 358-361.

- Huang, L.J., Durick, K., Weiner J.A., Chun, J. y Taylor, S.S. (1997), *J. Biol. Chem.* 272: 8057-8064.
- Hunter, T. (1995), *Cell* 80: 225-236.
- Inagaki, N., Ito, M., Nakano, T. y Inagaki, M. (1994), *Trends Biochem. Sci.* 19: 439-518.
- Ishikawa, T. (1989), *Bot. Mag. Tokyo* 102: 471-490.
- Jackiw, V. y Hunzicker-Dunn, D. (1992), *J. Biol. Chem.* 267: 14335-14344.
- Jackson, S.L. y Heath I.B. (1990), *Protoplasma* 157: 144-153.
- Jahnsen, T., Hedin, L., Kidd, V.J., Beattie, W.G. y Lohmann, S.M. (1986), *J. Biol. Chem.* 261: 12352-12361.
- Jones, B.E., Bu'Lock, J.D. (1977), *J. Gen. Microbiol.* 103: 29-36.
- Kachatrian, L., Howlett, A. y Klein, C. (1987), *J. Biol. Chem.* 262: 8071-8076.
- Kanbe, T., Kobayashi, I. y Tanaka, K. (1989), *J. Cell Sci.* 94: 647-656.
- Kase, H., Iwahashi, K., Nakanishi, S., Matsuda, Y., Yamada, K., Takahashi, M., Murakata, C., Sato, A., Kaneko, M. (1987), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142: 436-440.
- Kawata, M., Kikuchi, A., Hoshijima, M., Yamamoto, K., Hashimoto, E., Yamamura, H., y Takai, Y. (1989), *J. Biol. Chem.* 264: 15688-15695.
- Kemp, B.E., Benjamini, E. y Krebs, E.G. (1976), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 1038-1042.
- Kemp, B.E., Bylund, D.B., Huang, T.S. y Krebs, E.G. (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3448.
- Kemp, B.E., Graves, D.J., Benjamini, E. y Krebs, E.G. (1977), *J. Biol. Chem.* 252: 4888.
- Kerner, N., Moreno, S., Passeron S. (1984), *Biochem. J.* 219: 293-299.
- Kerner, N. y Passeron, S. (1984), *Mol. Cell. Biochem.* 60: 115-122.
- Kim, J.Y., Haastert, P.V. y Devreotes, P.N. (1996), *Chem. Biol.* 3: 239-243.
- Klauck, T.M., Faux, M.C., Labudda, K., Langeberg, L.K., Jaken, S. y Scott J.D. (1996), *Science* 271: 1589-1592.
- Klein, P.S., Sun, T.J., Saxe, C.L., Kimmel, A.R., Johnson, R.L. y Devreotes, P.N. (1988), *Science* 241: 1467 - 1472.
- Knapp, W. (1995), *J. Immunol.* 154: 5452-5463.
- Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., Xoung, N., Taylor, S.S. y Sowadski, J.M. (1991), *Science* 253: 407-414.
- Kobori, H., Sato, M., Osumi, M. (1992), *Protoplasma* 167: 193-204.
- Krebs, E.G., y Beavo, J.A. (1979), *Annu. Rev. Biochem.* 48: 923-959.
- Kreisberg, J.I., Ghosh-Choudhury, N., Radnick R.A., Schwartz, M.A. (1997), *Am. J. Physiol.* 273: 283-288.

- Kuo, S. C., Lampen, J.O. (1975), *Biochim. Biophys. Acta.* 389: 145-153.
- Kuret, J., Johnson, K., Nicolette, C. y Zoller, M.J. (1988), *J. Biol. Chem.* 263: 9149-9154.
- Ladant, D. (1988), *J. Biol. Chem.* 263: 1612-2618.
- Lanagan, T.A. (1973), *Adv. Cyc. Nucl. Res.* 3: 99.
- Landmark, B.F., Fauske, B., Esklid, W., Skålhegg, B., Lohmann, S.M., Hansson, V., Jahnsen, T. y Beebe, S.J. (1991), *Endocrinology* 129: 2345-2354.
- Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M., y Bertoglio, J. (1996), *EMBO J.* 15: 510-519.
- Lang, P., Guizani, L., Vitté-Mony, I., Stancou, R., Dorseuil, O., Gacon, G., y Bertoglio, J. (1992), *J. Biol. Chem.* 267: 11677-11680.
- Lapetina, E.G., Lacal, J.C., Reep, B.R. y Molina y Vedia L. (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3131-3134.
- Larsen, A., Sypherd, P. (1974), *J. Bacteriol.* 117: 432-438.
- Lee, D.C., Carmichael, D.F., Krebs, E.G. y McKnight, G.S., (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3608-3612.
- Levin, L.R. y Zoller, M.J. (1990), *Molec. Cell. Biol.* 10: 1065 -1075.
- Li, M., West, J.W., Numann, R., Murphy, B.J. Scheuer, T, y Catterall, W.A.(1993), *Science* 261: 1439-1442.
- Liu, A.Y.C. (1982), *J. Biol. Chem.* 257: 298-306.
- Liu, H. y Bretscher, A. (1992), *J. Cell Biol.* 118: 285-300.
- Londesborough, J. y Suoranta, K. (1988), *Method. Enzymol.* 159: 777-786.
- Lowry, O.H., Roseborough, N.J., Farr, A. y Randall, R. (1951), *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lu, X., Gross, R.E., Bagchi, S. y Rubin, C.S. (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 3293-3303.
- Machesky, L.M. y Hall A. (1996), *T. Cell Biol.* 6: 304-310.
- Maggese, M.C., Galvagno, M.A., Cantore, M.L. y Passeron, S. (1982), *Cell. Biol. Intl. Rep.* 6 : 1101-1108.
- Maia, J.C. y Camargo,E. (1974), *Cell. Differ.* 3: 147-155.
- Marchant, R. y Robards, A. W. (1968), *Ann. Bot. Fenn.* 32: 457-471.
- Marks, J., y Hyams, J.S. (1985), *Eur. J Cell Biol.* 39: 27-32.
- Marques, M.V. y Gomes, S.L. (1992), *J. Biol. Chem.* 267: 17201-17207.
- Matsumoto, K., Uno, I. y Ishikawa, T. (1983), *Cell* 32: 417-423.
- Mazurov, A.V., Misselwitz, F., Hoffman, U., Leytin, V. L., Repin, V.S. (1988), *Prostaglandins* 35: 51-66.
- McCaffrey, M., Johnson, J.S., Goud, B., Myers, A.M., Rossier, J., et al. (1991), *J. Cell Biol.* 115: 309-319.

- McConnell, S.J., y Yaffe, M.P. (1993), *Science* 260: 687-689.
- McKerracher, L.J. y Heath, I.B. (1987), *Exp. Mycol.* 11: 79-100.
- Miller, S.S., Wolf, A.M. y Arnaud, C.D. (1976), *Science* 192:1340-1343.
- Mitchell, T.K., Dean, R.A. (1995), *Plant Cell* 7: 1869-1878.
- Mizyricki, C. L. (1998). *Tesis de licenciatura*. FCEN. UBA.
- Money, N.P. (1994), En: *The Mycota I*. J.G.H. Wessel, F. Meinhardt. (Eds.). Springer-Verlag. Berlín.
- Moreno, S. y Passeron, S. (1980), *Arch. Biochem. Biophys.* 199: 321-330.
- Moreno, S., Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1982), *Arch. Biochem. Biophys.* 214: 573-580.
- Morii, N., Teru-Uchi, T., Tominaga, T., Kumagai, N., Kozaki, S., Ushikubi, K., y Narumiya, S. (1992), *J. Biol. Chem.* 267: 20916-20920.
- Mosbashery, S. y Kaiser, E.T. (1988), *Biochemistry* 27: 3691-3696.
- Muller, G y Bandlow, W. (1991), *Biochemistry* 30 : 10181-10190.
- Mutzel, R., Lacombe, M., Simon, M.N., de Gunzburg, J. y Veron, M., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6-10.
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohono, H., et al. (1995), *EMBO J.* 14: 5931-5938.
- Novick, P. y Botstein, D. (1985), *Cell* 40: 405-416.
- Obregón, A., Monzalvo, S., Calvo-Méndez, C., Ruiz-Herrera, J. (1990), *Cryptogamic Botany* 1: 323-331.
- Oliveira, J.C.F.D., Borges, A.C.C., Marques, M.D. y Gomes S.L. (1994), *Eur. J. Biochem.* 219: 1-2.
- Orlowski, M. (1979), *Biochem. J.* 182: 547-554.
- Orlowski, M. (1980), *Arch. Microbiol.* 126: 133-140.
- Orlowski, M. (1991), *Microbiol. Rev.* 55: 234-258.
- Ortiz, J.R., Yamada, T. y Hsie, A.W. (1973), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2286-2290.
- Otten, J., Johnson, G.S. y Pastan I. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 44: 1192-1198.
- Otten, J., Johnson, G.S. y Pastan I. (1972), *J. Biol. Chem.* 247: 7082-7087.
- Pall, M. (1981), *Microbiol. Rev.* 45: 462-480.
- Paravicini, G., et al. (1992), *Mol. Cell Biol.* 12: 4896.
- Pastori, R., Moreno, S. y Passeron, S. (1985), *Mol. Cell. Biochem.* 69: 55-66.
- Pastori, R., Kemer, N., Moreno, S. y Passeron, S. (1981), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 663-671.
- Paveto, M.C., Passeron, S., Corbin, J. y Moreno, S. (1989), *Eur. J. Biochem.* 179: 429.

- Paveto, M.C.**, (1987), *Tesis Doctoral*, FCEN. UBA.
- Paveto, M.C.**, Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1980), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167: 1177-1181.
- Paznokas, J.**, Sypherd, P. (1975), *J. Bacteriol.* 124: 134-139.
- Paznokas, J.**, Tripp, M.L., Wertman, K. (1982), *Exp. Mycol.* 6: 185-189.
- Qadota, H.**, Anraku, Y., Botstein, D. y Ohya, Y. (1994), *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 91: 9317-9321.
- Qadota, H.**, Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E. y Ohya Y. (1996), *Science* 272: 279-281.
- Quilliam, I.A.**, Mueller, H., Bohl, B.P., Prossnitz, V., Sklar, I. A., Der, C. J. y Bokoch, G.M. (1991), *J. Biol. Chem.* 147: 1628-1635.
- Rangel-Aldao, R.** y Rosen, O. (1977), *J. Biol. Chem.* 252: 7140-7145.
- Reyes, E.** y Ruiz Herrera, J. (1972), *Biochim. Biophys. Acta* 273: 328-335.
- Ridley, A.J.** (1996). *Curr. Biol.* 6: 1256-1264.
- Robison , G.A.**, Butcher, R.W. y Sutherland, E.W. (1971), En: *Cyclic AMP*. Academic Press. New York.
- Rodgers, B.**, Kulyk, W., Kosher, R. (1989), *Cell Differ. Dev.* 28: 179-188.
- Roesler, W.J.**, Vandenbark, G.R., y Hanson, R.W. (1988), *J. Biol. Chem.* 263: 9063-9066.
- Rosa, A.L.**, Alvarez, M.E., y Maldonado, C. (1990), *Exp. Mycol.* 14: 372-380.
- Rosen, O.M.** y Erlichman, J. (1975), *J. Biol. Chem.* 250: 7788-7794.
- Rosenberg, G.B.** y Pall, M. (1978), *Arch. Microbiol.* 118: 87-90.
- Rosenberg, P.A.** (1992), *Brain Res. Bull.* 29: 315-318.
- Roskoski, R.** (1983), *Methods Enzymol.* 99: 168-175.
- Rossi, S.**, Guthman, M. y Moreno, S. (1992). *Cell. Signal.* 4: 443-451.
- Rossi, S.** y Moreno, S. (1994), *Eur. J. Biochem.* 222: 501-506.
- Rubin, C.S.**, Rangel-ALdao, R., Sarkar, D., Erlichman, J. y Fleischer, N. (1979), *J. Biol. Chem.* 254: 3797-3805.
- Ruiz-Herrera, J.**, Calvo-Méndez, C. (1987), *Exp. Mycol.* 11: 287-296.
- Russel, D.H.**, (1978), *Adv. Cyc. Nucl. Res.* 4: 311-321.
- Sabanero, M.** (1994), *Microbios* 80: 91-97.
- Sabanero, M.** y Zazueta, R. (1989), *FEMS Microbiol. Lett.* 60: 227-232.
- Sánchez- Madrid, F.** y del Pozo, M. A. (1999), *EMBO J.* 18: 501-511.
- Schwartz, D.A.** y Rubin C.S. (1983), *J. Biol. Chem.* 258: 777-784.
- Schwoch, G.** (1987), *Biochem. J.* 248: 243-250.

- Scott, J.B., Glaccum, M.B., Zoller, M.J., Unhler, M.D. y Helfman, D.M., (1987), *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 84: 5192-5197.
- Scott, J.D. (1991), *Pharmacol. Ther.* 50: 123-145.
- Scott, J.D. (1997), *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 52: 227-239.
- Scott, J.D. y McCartney, S. (1994), *Mol. Endocrinol.* 8: 5-11.
- Sentandreu, R., Mormeneo, S. y Ruiz-Herrera. J. (1994), En: *The Mycota I. Growth, Differentiation and Sexuality*. Eds. Wessels y Meinhardt.
- Shabb, J.B. y Corbin, J.D. (1992), *J. Biol. Chem.* 267: 5723-5726.
- Shaltiel, S., Schvartz, I., Korc-Grodzicki, B, y Kreizman, T. (1993), *Mol. Cell. Biochem.* 127-128: 283-291.
- Shaw, N.M. y Harding, R.W. (1987), *Plant Physiol.* 83: 377-383.
- Shenolikar, S. (1987), *J. Cyc. Nucl. Prot. Phos. Res.* 11: 531-541.
- Sheppard, J.R. (1971). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1316.
- Shimoyama, M.M., Kawai, M., Tanigawa, Y. y Vedo, I. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47: 59-65.
- Shoji, S., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Fisher, E.H. y Titani K (1983), *Biochemistry* 22: 3702-3709.
- Showers, M.O. y Mauer, R.A. (1986), *J. Biol. Chem.* 261: 15360-15361.
- Sietsma, J.H. y Wessels, J.G.H. En: *The Mycota I.* J.G.H. Wessels y F. Meinhardt. (Eds.). Springer-Verlag. Berlin.
- Silberstein, S., Cantore,M.L., Galvagno, M.A. y Passeron, S. (1990), *Arch. Biochem. Biophys.* 282: 132-140.
- Skålhegg, B.S., Taskén, K., Hansson, V. Huitfeldt H.S., Jahnsen, T. y Lea, T. (1994), *Science* 263: 84-87.
- Skålhegg, B.S., y Taskén, K. (1997), *Frontiers in Bioscience* 2: 331-342.
- Spruill, W.A., White, M.G., Steiner, A.L., Tres, L.L. y Kierszenbaum, A.L. (1981), *Exp. Cell. Res.* 131: 131-148.
- Steimberg, R. A. y Agard, D.A. (1981), *J. Biol. Chem.* 256: 10731-10734.
- Steinbach, J.H. y Schubert, D. (1975), *Exp. Cell. Res.* 91: 449-53.
- Steinberg, R., Cauthron, R., Symcox, M. y Shuntoh, H. (1993), *Molec. and Cell. Biol.* 13: 2332-2341.
- Steiner, A.L., Parker, C.W. y Kipnis, D.M. (1972), *J. Biol. Chem.* 247: 1106-1113.
- Stockl, J., Madjic, O., Pickl, W.F., Rosenkranz, A., Prager, E., Gschwantler, E., Sung, C.P., Arleth, A.J., Storer, B. y Feuerstein,G.Z. (1991), *Life Sci.* 49: 375-382.
- Suoranta, K. y Londesborough, *J. Biol. Chem.* 259: 6964-6971.
- Sutherland, E.W. y Rall, T.W. (1958), *J. Biol. Chem.* 232: 1077-1091.

- Sutherland, E.W. y Wosilait, W.D. (1955), *Nature* 175: 169-170.
- Sypherd, P., Borgia, P., Paznokas, J. (1978), *Adv. Microb. Physiol.* 18: 67-104.
- Tang, W. y Gilman, A. G. (1992), *Cell* 70: 869-872.
- Tao, M. y Lipmann, F. (1969), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63: 86.
- Tash, J.S., Kakar, S.S. y Means, A.R. (1984), *Cell* 38: 551-559.
- Taskén, K.A., Knutsen, H.K., Attramadal, H., Taskén, K; Jahnsen, T.; Hansson, V. y Esklid, W. (1991), *Molec. Endocrinol.* 5: 21-28.
- Taussig, R. y Gilman, A.G. (1995), *J. Biol. Chem.* 270: 1-4.
- Taylor, S.S. y Radzio-Andzelm, E. (1994), En: *Protein Kinases*. J. Woodgett. IRL Press, Oxford University press. New York.
- Terenzi, H.F., Rosellino, E. y Passeron, S. (1971), *Eur. J. Biochem.* 18 : 342.
- Thevelein, J.M. (1994), *Yeast* 10: 1753-1790.
- Thompson, W.J., Ross, C., Pledger, W.J., Strada, S., Banner, R., Hersh, E. (1976). *J. Biol. Chem.* 251 : 4922-4929.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M. Scott, J.D., McMullen, B., Hurwitz, M., Krebs, E.G. Wigler, M. (1987), *Mol. Cell. Biol.* 7:1371-1377.
- Toda, T. Cameron, S. Sass, P., Zoller, M. y Wigler, M. (1987), *Cell* 50: 277-287.
- Tomes, C. y Moreno, S. (1990), *Exp. Mycol.* 14: 78-83.
- Tomes, C., Rossi, S., Moreno, S. (1993), *Cell. Signal.* 5: 615-621.
- Torruella, M., Flawiá, M., Eisenschlos, C.; Molina y Vedia, L.; Rubinstein, C. y Torres, H. (1986), *Biochem. J.* 234: 145-150.
- Tortora, G., Damiano, V., Bianco, C, et al. (1997), *Oncogene* 14: 923-928.
- Toshioka, T., Hidaka, H. (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 5267-5272.
- Tursken, K., Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N., Aubin, J.E. (1990), *J. Cell Physiol.* 142: 61-69.
- Ulloa, R. (1988), *Tesis Doctoral*, FCEN.UBA.
- Ulloa, R., Mesri, E., Esteva, M., Torres, H.N. y Tellez- Iñón, M.T. (1988), *Biochem. J.* 255: 319.
- Unemori, E.N. y Werb, Z. (1986), *J. Cell Biol.* 103: 1021-1031.
- Van Laere, A.J. (1986a), *Exp. Mycol.* 10: 52-59.
- Van Laere, A.J. (1986b), *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 189-198.
- Van Lookeren Campagne M.M., Villalba Díaz, F., Jastorff, B., Winkler, E., Genieser, H., Kessin, R.H. (1990), *J. Biol. Chem.* 265: 5847-5854.
- Walsh, D.A., y Van Patten. (1994), *FASEB J.* 8: 1227-1236.
- Walsh, D.A., Perkins, J.P. y Krebs, E.G. (1968), *J. Biol. Chem.* 243: 2867-2873.

- Walsh, D.A., Ashby, C.D., Gonzalez, C., Calkins, D., Fisher, E.H. y Krebs, E.G. (1971), *J. Biol. Chem.* 246: 1977-1985.
- Walter, U., Eigenthaler, M., Geiger, J., Reinhard, M. (1993), *Adv. Exp. Med. Biol.* 344: 237-249.
- Watts, F.Z., Miller, D.M. y Orr, E. (1985), *Nature* 316: 83-85.
- Watts, F.Z., Shields, G. y Orr, E. (1987). *EMBO J.* 6: 3499-3505.
- Wertman, K.F. y Paznokas, J.L. (1981), *Exp. Mycol.* 5: 314-322.
- Whitehouse, S. y Walsh, D.A. (1982), *J. Biol. Chem.* 257: 6028-6032.
- Worthington Enzyme Manual (1972). Worthington Biochemical Corp., Freenold, New Jersey.
- Yamochi, W., Tanaka, K., Nonaka, H., Maeda, A., Musha, T. y Takai, Y. (1994), *J. Cell Biol.* 125: 1077-1093
- Zick, S. y Taylor, S.S. (1982), *J. Biol. Chem.* 257: 2287-2293.
- Zoller, M.J. y Taylor, S.S. (1979), *J. Biol. Chem.* 254: 8363-8368.

Libro de mano

